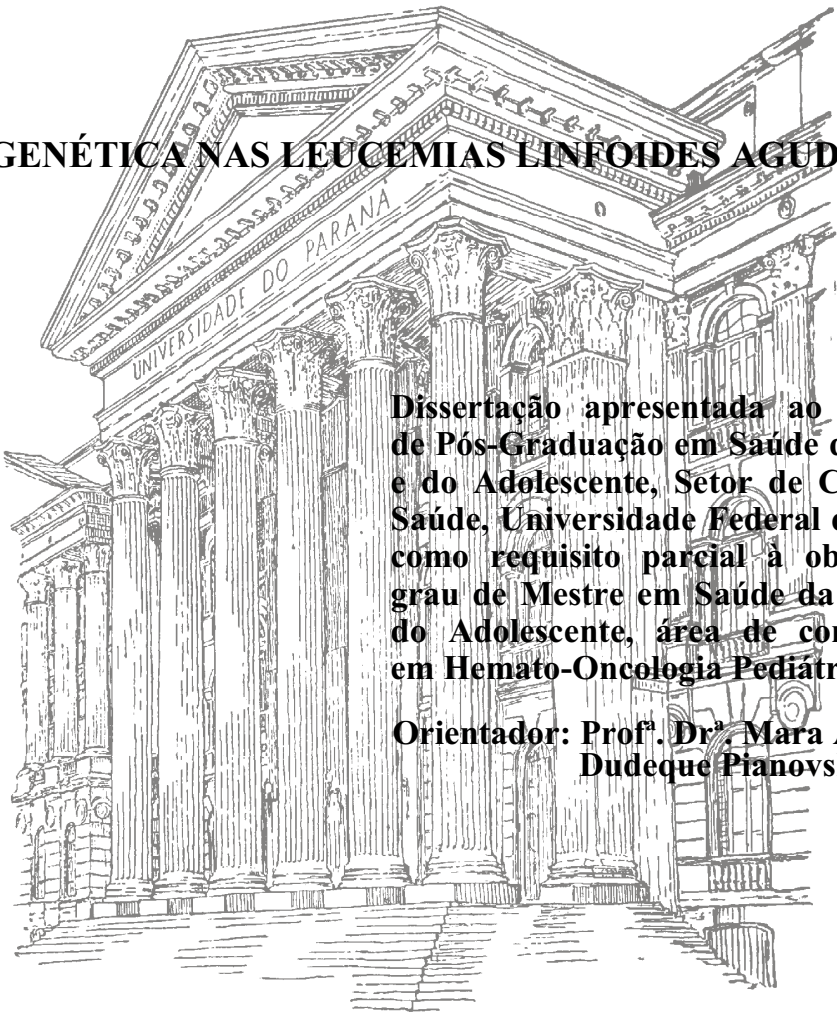


LENIZA COSTA LIMA LICHTVAN

CITOGENÉTICA NAS LEUCEMIAS LINFOIDES AGUDAS



Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração em Hemato-Oncologia Pediátrica.

**Orientador: Prof.^a Dr.^a Mara Albonei
Dudeque Pianovski**

CURITIBA

2007

“A coragem no caminho faz o caminho se manifestar”.

Jerônimo Walmir Costa Lima

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Mara Albonei Dudeque Pianovski, pela orientação, amizade, compreensão, estímulo e paciência para realização dessa pesquisa, pelo exemplo de docência e medicina.

À Dra. Mônica Cat, pela grande colaboração e minuciosa análise estatística.

À equipe do Serviço de Citogenética do Hospital de Clínicas da UFPR, em especial a Duka, Tamara e Ana Tereza, pelo conhecimento compartilhado, atenção e esclarecimento de dúvidas.

Ao Professor Iglénir João Cavalli, pela atenção, ajuda e disposição.

Às Dras. Marister Malvezzi, Miriam Beltrame e equipe do Serviço de Imunofenotipagem do Hospital de Clínicas da UFPR, pela disposição em ajudar e apoio.

À toda a equipe dos Serviços de Oncologia Pediátrica dos Hospitais Erasto Gaertner e Pequeno Príncipe, pelo auxílio com os prontuários dos pacientes estudados.

À equipe de médicos do Serviço de Oncologia Pediátrica do Hospital Erasto Gaertner: Dra. Érica Yamauchi, Dra. Suely Zanon Voss, Dr. Lisandro Lima Ribeiro, Dr. Ricardo Reis Blum e Dra. Lizana Arend Henrique pela compreensão nos momentos em que necessitei estar ausente.

Às secretárias Luzia Santos e Clara Lara de Freitas do Hospital de Clínicas da UFPR por sua dedicação e disposição em ajudar sempre.

Aos meus pais, Jerônimo Walmir e Emília Costa Lima, um agradecimento

especial pela confiança, pelo exemplo de caráter e estímulo, fundamentais para realização dos meus objetivos.

Ao meu esposo Ivan, pelo amor, carinho, atenção, paciência, estímulo e apoio incondicional.

À minha irmã, Gilza Costa Lima e ao meu cunhado Sérgio Ricardo Lazarini, pelo carinho, apoio e por estarem sempre presentes. À minha sobrinha Letícia pela alegria que trouxe a minha vida.

À minha cunhada Kátia, pela amizade e estímulo.

À colega Dra. Carolina Martins de Almeida, pelo auxílio na revisão de prontuários.

Às amigas, Dras. Annick Beaugrand, Gisele Loth e Juliana Schimtz, agradecimento especial pela ajuda, apoio, incentivo, compreensão e colaboração na montagem da dissertação.

Aos pacientes e seus familiares pela compreensão e participação nesse estudo.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE GRÁFICOS.....	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS.....	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS	5
2 REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1 HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA DA LLA	6
2.2 GENÉTICA.....	6
2.3 PATOGÊNESE.....	9
2.4 DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO	11
2.4.1 CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E CITOQUÍMICA.....	12
2.4.2 CLASSIFICAÇÃO PELA IMUNOFENOTIPAGEM.....	15
2.4.2.1 LLA PRÉ-B PRECOCE OU PRÓ-B.....	16
2.4.2.2 LLA PRÉ-B	18
2.4.2.3 LLA B TRANSICIONAL	18
2.4.2.4 LLA B.....	19
2.4.2.5 LLA T.....	19
2.4.2.6 MARCADORES MIELÓIDES	20
2.4.2.7 CD45	22
2.4.2.8 CD34	23
2.4.2.9 CD20	24
2.4.2.10 CD10	24
2.4.3 CLASSIFICAÇÃO PELA EXPRESSÃO GÊNICA.....	25
2.5 CITOGENÉTICA	26
2.5.1 NOMENCLATURA	27
2.5.2 TÉCNICAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS	29

2.5.2.1 CITOGENÉTICA CONVENCIONAL (CC)	29
2.5.2.2 HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE <i>IN SITU</i> (FISH).....	31
2.5.2.3 CITOMETRIA DE FLUXO (FC)	32
2.5.2.4 CARIOTIPAGEM POR ESPECTRO COLORIDO (SKY).....	32
2.5.2.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	33
2.5.2.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE COM TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-PCR).....	34
2.5.2.7 PCR <i>REAL TIME</i>	34
2.5.2.8 HIBRIDIZAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA (CGH)	34
2.5.3 ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS.....	37
2.5.3.1 ALTERAÇÕES NUMÉRICAS	38
2.5.3.1.1 HIPERDIPLOIDIA COM MAIS DE 50 CROMOSSOMOS	38
2.5.3.1.2 <i>NEAR</i> - TETRAPLOIDIA E <i>NEAR</i> - TRIPLOIDIA	41
2.5.3.1.3 HIPERDIPLOIDIA DE 47 A 50 CROMOSSOMOS	42
2.5.3.1.4 PSEUDODIPLOIDIA.....	43
2.5.3.1.5 DIPLOIDIA.....	43
2.5.3.1.6 HIPODIPLOIDIA	44
2.5.3.2 ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS	45
2.5.3.2.1 t(9;22)(q34;q11) – CROMOSSOMO FILADÉLFIA.....	45
2.5.3.2.2 t(1;19)(q23;p13).....	49
2.5.3.2.3 t(12;21)(p13;q22).....	52
2.5.3.2.4 t(8;14); t(8;22) E t(2;8)	55
2.5.3.2.5 ANORMALIDADES EM 11q23 – t(4;11)(q21;q23)	56
2.5.3.2.6 ANORMALIDADES EM 6q	58
2.5.3.2.7 ANORMALIDADES EM 9p	59
2.5.3.2.8 ANORMALIDADES EM 12p	60
2.5.3.2.9 LLA-T.....	61
2.5.3.2.10 t(11;14)(p13;q11).....	62
2.5.3.2.11 t(11;14)(p15;q11).....	62
2.5.3.2.12 t(10;14)(q24;q11).....	63
2.5.3.2.13 t(8;14)(q24;q11).....	63
2.5.3.2.14 t(1;14)(p33;q11).....	63
2.5.3.2.15 ANORMALIDADES EM 7q34-35.....	63

2.6 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	64
2.7 ALTERAÇÕES LABORATORIAIS	66
2.8 DOENÇA EXTRAMEDULAR.....	67
2.9 FATORES PROGNÓSTICOS	69
2.9.1 IDADE	69
2.9.2 CONTAGEM DE LEUCÓCITOS	70
2.9.3 CARACTERÍSTICAS DA IMUNOFENOTIPAGEM	70
2.9.4 ANORMALIDADES CROMOSSÔMICAS	71
2.9.5 ENVOLVIMENTO DE SNC AO DIAGNÓSTICO	72
2.9.6 RESPOSTA AO TRATAMENTO DE INDUÇÃO.....	72
2.9.7 DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA	72
2.9.8 SEXO	73
2.9.9 ETNIA.....	74
2.9.10 FATORES FARMACODINÂMICOS E FARMACOGENÉTICOS	74
2.9.11 ESTUDOS PARA ANÁLISE DE FATORES PROGNÓSTICOS	75
2.10 TRATAMENTO.....	77
2.10.1 INDUÇÃO DE REMISSÃO	78
2.10.2 TRATAMENTO DO SNC.....	79
2.10.3 INTENSIFICAÇÃO	79
2.10.4 MANUTENÇÃO	80
2.11 RECIDIVA	81
3 MATERIAIS E MÉTODOS	82
3.1 PACIENTES	82
3.2 CITOGENÉTICA CONVENCIONAL	82
3.2.1 CULTURA E PREPARAÇÃO CITOLÓGICA	82
3.2.2 BANDEAMENTO CROMOSSÔMICO GTG	83
3.2.3 ANÁLISE	83
3.3 ANÁLISE DOS PRONTUÁRIOS	84
3.4 ESTATÍSTICA	84
4 RESULTADOS.....	86
4.1 CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES.....	86
4.2 FREQUÊNCIA DAS ANORMALIDADES CROMOSSÔMICAS	90
4.3 TRATAMENTO.....	94

4.4 RECIDIVAS E ÓBITOS	94
4.5 ASSOCIAÇÃO DAS VARIÁVEIS COM RECIDIVA E ÓBITO.....	95
4.6 CURVAS DE KAPLAN-MEIER – ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA.....	96
4.7 ANÁLISE MULTIVARIADA – REGRESSÃO DE COX	101
5 DISCUSSÃO	103
6 CONCLUSÕES	116
REFERÊNCIAS.....	118
ANEXOS	143

LISTA DE TABELAS

1.	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DOS SUBTIPOS DE LLA.....	13
2.	CLASSIFICAÇÃO DA LLA PELA IMUNOFENOTIPAGEM	17
3.	COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE VÁRIOS ESTUDOS EM RELAÇÃO A PORCENTAGEM DE ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS IDENTIFICADAS PELOS MÉTODOS DE CC, FISH, CGH E SKY	37
4.	SOBREVIDA LIVRE DE EVENTOS (SLE), SOBREVIDA GLOBAL (SG) E TEMPO MÉDIO DE RECIDIVA EM MESES PARA PACIENTES COM <i>TEL-AML1</i> E SEM <i>TEL-AML1</i>	54
5.	DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES CONFORME FAIXA ETÁRIA	86
6.	DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES CONFORME O SEXO	86
7.	DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES CONFORME A COR.....	86
8.	TEMPO DE INÍCIO DOS SINTOMAS	87
9.	SINAIS E SINTOMAS MAIS COMUNS	87
10.	ACHADOS MAIS FREQUENTES NO EXAME FÍSICO.....	88
11.	VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DE HEMOGLOBINA AO DIAGNÓSTICO	88
12.	CONTAGEM DE LEUCÓCITOS AO DIAGNÓSTICO	89
13.	CONTAGEM DE PLAQUETAS AO DIAGNÓSTICO	89
14.	DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES CONFORME LINHAGEM DA LLA	90
15.	RESULTADOS DA CC NOS 114 PACIENTES COM EXAME REALIZADO AO DIAGNÓSTICO.....	90
16.	FREQÜÊNCIAS DOS GRUPOS DE PACIENTES PELO NÚMERO MODAL DE CROMOSSOMOS, FREQÜÊNCIAS DAS ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS E DISTRIBUIÇÕES DAS TRISSOMIAS E MONOSSOMIAS EM CADA GRUPO.....	92

17.	ACHADOS DE CITOGENÉTICA AO DIAGNÓSTICO DOS 114 PACIENTES COM LLA	93
18.	ACHADOS DE CITOGENÉTICA NOS 19 PACIENTES COM RESULTADO DA RECIDIVA OU APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO.....	94
19.	OCORRÊNCIA DE RECIDIVAS E ÓBITOS ENTRE OS 133 PACIENTES.....	95
20.	VARIÁVEIS ANALISADAS POR REGRESSÃO DE COX	102
21.	ANÁLISE DA t(4;11) POR REGRESSÃO DE COX.....	102
22.	COMPARAÇÃO DAS PORCENTAGENS DE PACIENTES COM IDADE ENTRE 1 E 10 ANOS	103
23.	FREQÜÊNCIA DO SEXO MASCULINO EM PACIENTES COM LLA.....	104
24.	COMPARAÇÃO ENTRE AS FREQÜÊNCIAS DAS QUEIXAS APRESENTADAS PELOS PACIENTES COM LLA (%)	105
25.	COMPARAÇÃO ENTRE AS FREQÜÊNCIAS DOS ACHADOS NO EXAME FÍSICO INICIAL (%).....	105
26.	FREQÜÊNCIA DOS SUBTIPOS DE LLA, EM DIFERENTES CASUÍSTICAS	107
27.	COMPARAÇÃO ENTRE FREQÜÊNCIA DAS PLOIDIAS NAS CRIANÇAS COM LLA (%)	109
28.	COMPARAÇÃO ENTRE AS PORCENTAGENS DE ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS NOS PACIENTES COM LLA.....	112
29.	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM t(4;11)	114

LISTA DOS GRÁFICOS

1.	RELAÇÃO DA CONTAGEM INICIAL DE LEUCÓCITOS NO GRUPO DE PACIENTES SOBREVIVENTES E NO DE PACIENTES QUE FORAM A ÓBITO.....	96
2.	CURVA DE KAPLAN-MEIER COMPARANDO SOBREVIDA ENTRE OS SEXOS.....	97
3.	CURVA DE KAPLAN-MEIER COMPARANDO SOBREVIDA EM RELAÇÃO À IDADE	98
4.	CURVA DE KAPLAN-MEIER COMPARANDO SOBREVIDA EM RELAÇÃO À CONTAGEM INICIAL DE LEUCÓCITOS	98
5.	CURVA DE KAPLAN-MEIER COMPARANDO SOBREVIDA EM RELAÇÃO À CLASSIFICAÇÃO CITOGENÉTICA	99
6.	CURVA DE KAPLAN-MEIER COMPARANDO SOBREVIDA DOS PACIENTES COM OU SEM A $t(4;11)(q21;q23)$	100
7.	CURVA DE KAPLAN-MEIER PARA SOBREVIDA GLOBAL	101

LISTA DE FIGURAS

1.	DIAGRAMA E PONTOS DE QUEBRA DA $t(9;22)(q34;q11)$	48
2.	AVALIAÇÃO DA $der(19)t(1;19)(q23;p13)$ POR CITOGENÉTICA CONVENCIONAL	50
3.	<i>C-PBX-1</i> EM CÉLULAS NORMAIS	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALL	- <i>acute lymphoblastic leukemia</i>
BFM	- Berlim-Frankfurt-Münster
CAE	- Cloroacetato esterase
CALLA	- <i>common acute lymphoblastic leukemia antigen</i>
CC	- Citogenética Convencional
CCG	- <i>Children's Cancer Group</i>
CD	- <i>cluster designation</i>
CGH	- Hibridização Genômica Comparativa
clgμ	- Imunoglobulina de cadeia pesada citoplasmática
del	- Deleção
der	- Cromossomo derivativo
dic	- Cromossomo dicêntrico
DNA	- Ácido desoxi-ribonucléico
DRM	- Doença Residual Mínima
dup	- Duplicação
EBV	- Epstein-Barr Vírus
EUA	- Estados Unidos da América
FAB	- classificação <i>French-American-British</i>
FC	- Citometria de Fluxo
FISH	- Hibridização Fluorescente <i>in situ</i>
HLA-DR	- <i>human leukocyte antigen</i> de classe II – DR
HLF	- fator hepático da leucemia
i	- Isocromossomo
IFNA	- gene interferon alfa
IFNB1	- gene interferon beta
IgH	- gene da Imunoglobulina de cadeia pesada

INCA	- Instituto Nacional do Câncer
inv	- Inversão
ISCN	- Sistema Internacional de Nomenclatura em Citogenética Humana
KCI	- Cloreto de potássio
LLA	- Leucemia Linfóide Aguda
LMA	- Leucemia Mielóide Aguda
LMC	- Leucemia Mielóide Crônica
mar	- Cromossomo marcador
MLL	- <i>myeloid/lymphoid leukemia</i> ou <i>mixed lineage leukemia</i>
MMII	- membros inferiores
MPO	- Mieloperoxidase
MRC UKALL XI	- Protocolo <i>Medical Research Council United Kingdom Acute Lymphoblastic Leukemia XI</i>
MTAP	- enzima metiltioadenosina fosforilase
PAS	- Ácido Periódico de Schiff
PCR	- Reação em cadeia da Polimerase
Ph	- Cromossomo Filadélfia
POG	- <i>Pediatric Oncology Group</i>
QRT-PCR	- Reação em cadeia da polimerase quantitativa <i>real-time</i>
RNA	- Ácido ribonucleico
RT-PCR	- Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
SBB	- Sudan Black B
slgμ	- Imunoglobulina de cadeia pesada de superfície
SKY	- Cariotipagem por Espectro Colorido
SNC	- Sistema Nervoso Central
t	- Translocação
TDT	- <i>terminal deoxynucleotidyl transferase</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	- por cento
°C	- Graus Celsius
g/dl	- grama por decilitro
g/l	- grama por litro
kb	- kilobase
kD	- kilodalton
ml	- mililitro
Mpb	- megapairbase
NaHPO ₄	- solução salina fosfatada
KH ₂ PO ₄	- fosfato monobásico de potássio
κ	- kappa
λ	- lambda
μ	- microlitro

RESUMO

A leucemia é a doença maligna mais comum na infância, representando 1/3 de todas as neoplasias pediátricas, com pico de incidência em pacientes entre 2 e 5 anos de idade. A leucemia linfóide aguda (LLA) caracteriza-se pela proliferação anormal de células linfóides imaturas. Alterações cromossômicas apresentam importância no diagnóstico e prognóstico da doença. A realização da citogenética convencional é o método de escolha para identificar as alterações cromossômicas, sendo que a maioria dos pacientes com LLA apresenta alterações citogenéticas nos blastos. Estas alterações podem ser numéricas ou estruturais e muitas delas apresentam valor prognóstico. Os objetivos deste estudo foram: descrever as características clínicas e laboratoriais, classificação por imunofenotipagem e as alterações cromossômicas encontradas em um grupo de pacientes pediátricos com LLA e verificar a relação destas alterações cromossômicas com o prognóstico. Foram avaliados 133 pacientes com diagnóstico de LLA, com idade variando de 0 a 14 anos. Os sinais e sintomas mais frequentes foram febre (58%), palidez (45%), dor nos MMII (39%) e astenia (38%). Em relação ao hemograma ao diagnóstico, a maioria dos pacientes apresentava hemoglobina abaixo de 10 g/dl (79%), contagem de leucócitos superior a 10.000/ μ l (57%) e contagem de plaquetas abaixo de 100.000/ μ l (73%). Os dados estão de acordo com os relatos de literatura. A maioria dos pacientes (93%) apresentava LLA de linhagem B, sendo 73% LLA pré-B precoce. Em 91% das LLAs de linhagem B e em 44% das de linhagem T houve expressão de CD10. Entre as alterações cromossômicas numéricas, a mais comum foi a pseudodiploidia, presente em 43% dos pacientes. Em relação às alterações cromossômicas estruturais, as mais frequentes foram a t(4;11)(q21;q23), presente em 6% dos pacientes; t(1;19)(q23;p13), em 4,5%; e anormalidades em 6q, em 6% dos casos. Foram evidenciados como fatores de pior prognóstico: idade menor que um ano; contagem inicial de leucócitos maior que 50.000/ μ l; presença de

hipodiploidia e de t(4;11)(q21;q23), o que está de acordo com a literatura.

Palavras-chave: leucemia linfóide aguda pediátrica, alterações cromossômicas, prognóstico.

ABSTRACT

The leukemia is one of the most common childhood malignancy, representing one third of all pediatric cancers, with peak of incidence between 2 and 5 years old. Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a disease characterized by the abnormal proliferation (overproduction and continuous multiplication) of immature cells of lymphoid series. Chromosomes abnormalities have great importance in the diagnosis and prognostic of the disease. Conventional cytogenetics is the traditional way to identify chromosomes abnormalities, which are present in leukemic cells of the majority of ALL patients. These changes include numerical and structural chromosomal abnormalities, some of which are powerful prognostic indicators. The purposes of this study were: describe clinical and laboratorial characteristics, immunophenotyping classification and the chromosomes abnormalities found in group of pediatric patients with ALL treated in referral institutions of Curitiba, Parana and verify the relation with the prognostic. One hundred and thirty three patients, between the ages of zero to fourteen years old were evaluated. The most frequent symptoms and signs were fever (58%), paleness (45%), bone pain (39%) and fatigue (38%). The hematologic abnormalities found at diagnosis were anemia (hemoglobin < 10g/dl) in 79% of patients; leukocyte counts was greater than 10.000/ μ l in 57% and platelet count was fewer than 100.000/ μ l in 73% of patients. These characteristics agree with those in the international literature. Immunophenotypically, 93% of patients were classified as B-lineage ALL; 73% of these children were early-pre-B cell ALL. CD10 was detected on the surface of leukemic cells in 91% of cases of B-lineage ALL and in 44% of cases of T-lineage ALL. Pseudodiploidy was the most frequent numerical chromosomal abnormality, found in 43% of patients. Among structural abnormalities, the most frequent were t(4;11)(q21;q23), in 6% of patients; t(1;19)(q23;p13) in 4,5% and 6q abnormalities, in 6% of patients. Some clinical and biological features conferred an adverse risk: age lower than one year, initial

leukocyte count greater than 50.000/ μ l, hipodiploidy and t(4;11)(q21;q23). These findings agree with those reported in literature.

Key-words: pediatric acute lymphoblastic leukemia, chromosomal abnormalities, prognosis

1 INTRODUÇÃO

A leucemia é a doença maligna mais comum da infância, correspondendo a 25% de todos os casos de neoplasias pediátricas. Resulta de uma proliferação desordenada de células hematopoéticas (de linhagem linfóide B ou T ou de linhagem mielóide), chamadas de blastos, que ocupam o espaço das células normais na medula óssea e disseminam-se para o sangue periférico e órgãos como baço, fígado e linfonodos. A leucemia foi reconhecida como entidade clínica em 1847, com a descrição realizada na Escócia, por Bennet, e na Alemanha, por Virchow (GUNZ¹ apud HÜSCH, 1989, p.2).

Tradicionalmente, as leucemias são agrupadas em agudas e crônicas com base na sua história natural e no nível de maturação das células neoplásicas. A leucemia aguda possui um curso clínico mais rápido, caracterizando-se por um defeito na maturação, o que induz a um acúmulo de células imaturas (blastos) e, se não tratada, leva ao óbito em poucas semanas ou meses. As leucemias crônicas, ao contrário, são definidas por hiperplasia maciça de elementos maduros e têm curso indolente, com história natural que pode durar até anos. As leucemias são classificadas em linfóide, mielóide ou bifenotípica, dependendo da linhagem de células afetada.

A leucemia linfóide aguda (LLA) corresponde a aproximadamente 80% de todos os casos de leucemia nas crianças. A incidência de LLA na população é de 1/25.000 indivíduos/ano de 0 a 14 anos (CAMARGO E LOPES, 2000). O pico de incidência da LLA ocorre entre 2 e 5 anos de idade (GREAVES et al., 1985; MARGOLIN, STEUBER e POPLACK, 2005).

¹ GUNZ, F.W. *Leukemia in the past*. Philadelphia, Henderson ES, Lister TA Leukemia. WB Saunders Company, 1983. p. 3-11.

Os fatores genéticos têm papel importante na leucemogênese. As evidências decorrem de várias observações, incluindo a demonstração de anormalidades cromossômicas nas células leucêmicas das crianças com LLA, a associação entre várias alterações cromossômicas constitucionais e LLA infantil, a ocorrência de leucemia familiar, bem como em gêmeos idênticos e a evidência epidemiológica molecular da importância de vários alelos de genes específicos, interferindo na metabolização de quimioterápicos (CHESSELLS, 2000).

A etiologia da LLA permanece desconhecida, embora sejam enfatizados como possíveis causas: efeitos da irradiação, exposição a drogas antineoplásicas, doenças genéticas hereditárias (como Síndrome de Down, ataxia-teleangiectasia, anemia de Fanconi), fatores imunológicos e exposições a alguns vírus. Uma hipótese que tem sido bastante pesquisada é a de que ocorra mutação genética, ainda no período intra-útero, e que exista um segundo evento após o nascimento, tal como infecção, por exemplo, capaz de desencadear a doença (GREAVES, 1999; WIEMELS et al., 1999). Normalmente são encontradas várias alterações genéticas nas células leucêmicas e não somente uma. Avaliações moleculares em vários pares de gêmeos idênticos, entre 2 meses de idade e 14 anos, no momento do diagnóstico, evidenciaram que a LLA, nestes gêmeos, originou-se da mutação e expansão clonal de uma célula em um dos fetos intra-útero (FORD et al., 1993, 1997, 1998; WIEMELS, 1999). Estudos utilizando amostras de sangue coletado para o teste do pezinho, de crianças que apresentaram leucemia, evidenciaram a presença das alterações cromossômicas já ao nascimento, o que favorece a hipótese da origem pré-natal da LLA (WIEMELS et al., 1999; TAUB et al., 2002; BURJANIVOVA et al., 2006).

Para confirmação do diagnóstico é necessária a presença de mais de 25% de blastos na medula óssea (MARGOLIN, STEUBER e POPLACK, 2005). A análise dos blastos, por imunofenotipagem e citogenética, permite conhecer o tipo da leucemia (B ou T) e avaliar a presença de alterações cromossômicas, que podem

ser numéricas (ploidia) ou estruturais (translocações, deleções, isocromossomos ou cromossomos marcadores).

Nas últimas décadas, o tratamento das crianças com leucemia permitiu atingir taxas de cura de até 80%, obtidas, principalmente, devido à intensidade dos esquemas quimioterápicos e radioterapia, os quais são responsáveis por diferentes seqüelas, tais como, cardiotoxicidade, infertilidade, alterações do crescimento, déficits neurocognitivos e outras. Assim, com a finalidade de se adequar a intensidade do tratamento à gravidade da doença, fatores prognósticos vêm sendo pesquisados. Alguns já estão bem estabelecidos, como a contagem de leucócitos, idade, presença de doença extramedular ao diagnóstico e resposta ao tratamento quimioterápico de indução. Contagem elevada de leucócitos, idade menor que um ano e maior que nove anos, infiltração de sistema nervoso central (SNC) ao diagnóstico, presença de mais de 5% de blastos na medula óssea, no final do tratamento quimioterápico de indução, são fatores de pior prognóstico (SATHER, 1986; GAJJAR et al., 2000; VAN DOUGEN et al., 1998).

Algumas alterações cromossômicas também são consideradas fatores prognósticos. Hiperdiploidia (mais de 46 cromossomos, especialmente mais de 50 cromossomos) confere prognóstico mais favorável, enquanto que blastos com menos de 46 cromossomos representam taxas mais elevadas de fracasso terapêutico (PUI et al., 1989; TRUEWORTHY et al., 1992; HEEREMA et al., 1999; ZEMANOVA et al., 2005; RAIMONDI et al., 2006). Algumas translocações como t(4;11)(q21;q23) e t(9;22)(q34;q11) têm sido bastante estudadas e estão associadas a taxas de cura bastante diminuídas. A t(4;11) está freqüentemente presente em crianças abaixo de um ano de idade, com hiperleucocitose e doença extramedular (ARTHUR et al., 1982; MIRRO et al., 1986; HEEREMA et al., 1994; PUI et al., 2002). A t(9;22), conhecida como cromossomo Filadélfia, é encontrada em crianças com idade maior, contagem elevada de leucócitos, alta porcentagem de blastos circulantes e também está associada a prognóstico pior (PRIEST et al., 1980; CRIST

et al., 1990; FLETCHER et al., 1992; ARICO et al., 2000). Outra translocação bastante conhecida é a t(12;21)(p13;q22), que resulta na fusão do gene *TEL* com o gene *AML1*, e confere melhor prognóstico, com boa resposta ao tratamento. É a translocação mais comum na LLA, encontrada em mais de 25% das crianças com LLA de linhagem B quando usadas técnicas de avaliação molecular. Esta alteração raramente é identificada pela citogenética convencional (CC) (ROMANA et al., 1994, 1995; VEIGA et al., 2004; MIGNON et al., 2006).

A técnica mais utilizada para identificação das anormalidades cromossômicas é a citogenética convencional (CC). No entanto, nem todas as alterações podem ser detectadas por este método, sendo necessárias outras técnicas complementares para melhor avaliação da LLA, como citometria de fluxo (FC), hibridização fluorescente *in situ* (FISH), cariotipagem espectral (SKY), reação em cadeia por polimerase reversa (PCR) e hibridização genômica comparativa (CGH) (DU MANOIR, 1993; PAJOR et al., 1998; RAIMONDI et al., 2000; NORDGREN et al., 2002).

Estes avanços técnicos na análise citogenética e na imunofenotipagem, têm contribuído para o entendimento da biologia da LLA e seu tratamento, permitindo torná-lo cada vez mais eficaz e menos tóxico, baseado nas características diagnósticas individuais de cada criança.

Há poucos trabalhos publicados sobre as alterações cromossômicas encontradas nas crianças com LLA no Brasil, assim como sua correlação com prognóstico. Este estudo tem a finalidade de descrever as aberrações cromossômicas presentes na população pediátrica com LLA, atendida em duas instituições de referência em oncologia pediátrica do Estado do Paraná e avaliar a correlação destas alterações com o prognóstico.

1.1 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivos:

1. Verificar as manifestações clínicas mais freqüentes em um grupo de crianças com diagnóstico de LLA.
2. Conhecer as alterações hematológicas observadas ao hemograma das crianças com LLA.
3. Classificar as LLA em imunofenótipos e conhecer a distribuição dos mesmos no grupo estudado.
4. Descrever as alterações citogenéticas encontradas e verificar sua associação com o prognóstico.
5. Verificar os fatores de pior prognóstico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA DA LLA

A leucemia é a doença maligna mais comum da infância, correspondendo a 25% de todos os casos de neoplasias pediátricas. Foi reconhecida como entidade clínica em 1847, com a descrição realizada na Escócia, por Bennet, e na Alemanha, por Virchow (GUNZ, 1983).

A LLA corresponde a 80% de todas as leucemias na criança (GREAVES, 1999). Aproximadamente 4900 crianças apresentam diagnóstico de LLA por ano nos EUA, com uma incidência de 3 a 4 casos/100.000 crianças brancas ou 29,2 casos por milhão, incluindo todas as crianças dos Estados Unidos da América (EUA) (MARGOLIN, STEUBER e POPLACK, 2005). Segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), esperava-se para o ano de 2006, de 4700 a 19000 casos de neoplasia infantil no Brasil. Sendo que a leucemia corresponde a 25% de todos os tumores malignos infantis, de 1175 a 4750 casos seriam de leucemia. Como a LLA representa 80% de todos os casos de leucemia, esperava-se para 2006, de 940 a 3800 casos de LLA no Brasil. No Estado do Paraná estima-se um número de 336 a 1346 casos de neoplasia infantil, sendo 67 a 269 casos de LLA, por ano.

O pico de incidência da LLA ocorre entre 2 e 5 anos de idade. Acomete, discretamente, mais o sexo masculino do que o sexo feminino. Nos Estados Unidos é mais comum em crianças da raça branca do que da raça negra (MCNALLY et al., 1997; MARGOLIN, STEUBER e POPLACK, 2005).

2.2 GENÉTICA

Os fatores genéticos têm um papel importante na LLA. As alterações cromossômicas constitucionais estão associadas à incidência aumentada de

leucemia infantil. Crianças com Síndrome de Down (trissomia do cromossomo 21) apresentam 15 a 20 vezes mais chances de desenvolver leucemia que as demais (ROWLEY² apud SILVERMAN e SALLAN, 2003, p.1121; DORDELMANN et al., 1998). A incidência aumentada de LLA também está documentada em outras doenças genéticas como Síndrome de Bloom, Anemia de Fanconi e ataxia-teleangiectasia (MILLER³ apud MARGOLIN, STEUBER e POPLACK, 2005, p. 540; DUKER, 2002; TISCHKOWITZ et al., 2004).

Estudos epidemiológicos sugerem que a leucemogênese ocorre em várias etapas, sendo o evento inicial, intra-útero e, o seguinte, uma alteração genética pós-natal (GREAVES, 1993 e 1997; SMITH et al., 1997). Várias duplas de gêmeos idênticos desenvolveram o mesmo tipo de LLA, com seqüências de fusão dos mesmos genes, sugerindo a hipótese da origem intra-útero da LLA pediátrica (FORD et al., 1993; GILL SUPER et al., 1994; MAHMOUD et al., 1995; FORD et al., 1998; GREAVES, 2003). Estudos têm sido realizados analisando amostras de sangue coletado para o teste do pezinho, de crianças que apresentaram leucemia, e foram evidenciadas alterações cromossômicas características de LLA nestas amostras, particularmente t(4;11) e t(12;21) (GALE et al., 1997; WIEMELS et al., 1999; FASCHING et al., 2000; YAGI et al., 2000). Alguns estudos realizados com sangue de cordão umbilical congelado e também com amostras do teste do pezinho comprovaram a existência de alterações cromossômicas pré-leucêmicas no momento do nascimento de um em 100 a um em 1000 recém-nascidos. Logicamente, a maioria destas crianças não irá desenvolver leucemia, mas esta é

² ROWLEY, J.D. Down Syndrome and acute leukaemia: Increased risk may be due to trissomy 21. **Lancet**, v. 2, p. 1020-22, 1981.

³ MILLER, R.W. Relation between cancer and congenital defects: an epidemiologic evaluation. **J Natl Cancer Inst**, v.40, p 1079-85, 1968.

uma evidência de que alguns eventos importantes que contribuem na leucemogênese podem ocorrer intra-útero (MORI et al., 2002).

Em um estudo realizado por Taub et al. (2002), foram analisados, retrospectivamente, 17 pacientes com diagnóstico de LLA pré-B entre 1982 e 1999, com idade entre 18 meses e 13 anos de idade, avaliando as amostras de medula óssea ao diagnóstico e amostras de sangue coletado para o teste do pezinho. Rearranjos do gene da imunoglobulina de cadeia pesada (*IgH*) foram analisados, nestas amostras, pela técnica de PCR e usados como marcadores específicos de leucemia. Dos 17 pacientes avaliados, em 12 (71%) foram detectados rearranjos clonais do gene *IgH*, comprovando a presença de um clone leucêmico ao nascimento originado intra-útero, com um período variável de latência para a expressão completa da doença.

A ocorrência de leucemia em gêmeos idênticos também desperta o interesse nesse aspecto. Em 1971, Boyse e Clarkson⁴, apud Greaves (1999, p.1947) sugeriram que a existência da leucemia em gêmeos ocorria por disseminação metastática de um feto para outro, ou seja, o clone leucêmico origina-se em um feto e dissemina-se para o outro através da anastomose vascular da placenta monocoriônica. Vários estudos publicados entre 1993 e 1999 evidenciaram que os pares de gêmeos idênticos apresentavam os mesmos pontos de quebra nos cromossomos, indicando a origem clonal comum da alteração. Em todos os casos avaliados o diagnóstico foi feito em idades diferentes, mostrando que o período de latência, após o evento leucêmico inicial, pode ser muito variável. Estas publicações reforçam a teoria de que a leucemia pode ter sua origem intra-útero e depende de um segundo evento, após o nascimento, para desencadear o desenvolvimento da

⁴ CLARKSON, B., BOYSE, E. A. Possible explanation of the high concordance for acute leukaemia in monozygotic twins. **Lancet**. 1971;ii: 699-701.

doença (FORD et al., 1993; GILL SUPER et al., 1994; MAHMOUD et al., 1995; CAMPBELL et al., 1996; FORD et al., 1997 e 1998, WIEMELS et al., 1999; GREAVES, 1999).

2.3 PATOGÊNESE

Além das alterações genéticas, fatores ambientais, infecções virais e imunodeficiências podem estar relacionados com o aparecimento da leucemia infantil. Entre os fatores ambientais estão a exposição à radiação e a certos quimioterápicos, como agentes alquilantes (SHU et al., 1994; ROSS et al., 1994). Também tem sido estudada a possibilidade da exposição à pesticidas e herbicidas aumentar o risco de desenvolvimento da leucemia, porém ainda não há estudos suficientes para comprovar esta hipótese (INFANTE-RIVARD et al., 1999). Estudos têm sido realizados na tentativa de identificar algum vírus que esteja relacionado com a etiologia da leucemia, assim como existe a relação do vírus Epstein-Barr (EBV) com casos de linfoma de Burkitt endêmico e linfoma de Hodgkin. Porém, até o momento, a relação causa-efeito não está esclarecida e a hipótese etiopatogênica mais provável é que ocorra uma resposta imune inadequada a algum tipo de infecção na infância, e não que um agente viral ou bacteriano específico desencadeie a leucemia (GREAVES, 1999). Anormalidades no sistema imune são observadas na época do diagnóstico de leucemia. Níveis baixos de imunoglobulinas séricas são encontrados em cerca de 30% dos pacientes, porém não foi comprovada se esta alteração é uma causa ou uma consequência da LLA (KONIOR e LEVENTHAL⁵, apud MARGOLIN, STEUBER e POPLACK, 2005, p. 543).

A suspeita da origem pré-natal da leucemia pediátrica motivou a realização

⁵ KONIOR, G.S, LEVENTHAL, B.G. Immunocompetence and prognosis in acute leukemia. **Semin Oncol**, v.3,p.283-88, 1976.

de estudos epidemiológicos procurando relacionar possíveis causas da LLA com o período de gestação, tais como características maternas e características da criança ao nascimento (KAYE et al., 1991; CNATTINGIUS et al., 1995; REYNOLDS et al., 2002; MURRAY et al., 2002). Alguns fatores, que já foram associados à leucemia infantil, incluem peso de nascimento elevado (ROBISON et al., 1987; YEAZEL et al., 1997; OKCU et al., 2002) e idade materna avançada (KAYE et al., 1991; DOCKERTY et al., 2001).

Alexander et al. (2001) publicaram estudo evidenciando a associação de LLA em crianças menores de um ano, que apresentavam rearranjo no gene *MLL*, com exposição das mães, durante a gravidez, a pesticidas, em particular o propoxur (Baygon®) e com o consumo de dipirona; SHARPE e FRANCO, em 1996, encontraram associação do uso desta medicação durante a gravidez com o desenvolvimento de tumor de Wilms.

Podvin et al. (2006) analisaram as características maternas e características, ao nascimento, de 595 recém-nascidos. Idade materna superior a 35 anos, peso de nascimento maior que quatro kg e icterícia neonatal, necessitando de fototerapia, foram associados a risco aumentado de desenvolvimento de LLA. Entre mulheres com mais de duas gestações, aquelas que tiveram dois abortos com idade gestacional inferior à 20 semanas, também apresentaram maior risco. A razão da associação do peso de nascimento com o risco de LLA ainda é desconhecida. Uma teoria propõe que níveis elevados de fatores de crescimento circulantes estimulam a transformação de células pré-malignas em leucêmicas (ROSS et al., 1996). A justificativa para o risco aumentado para mães com mais de 35 anos é o acúmulo de mutações cromossômicas e células germinativas mais velhas (HEMMINKI et al., 1999; ROSS et al., 2001). Para a icterícia, a explicação seria que a fototerapia origina radicais livres que circulam no neonato, resultando na transformação de linfoblastos, por alteração do DNA (BEN-SASSON et al., 1992).

Estudos epidemiológicos demonstraram que uma possível causa da LLA,

em crianças mais velhas com rearranjo *TEL-AML1* ou com hiperdiploidia, é a resposta anormal à infecção (GREAVES, 1997; PERRILLAT et al., 2002). A ausência de infecções comuns durante o primeiro ano de vida foi considerada um fator de risco para ocorrência de LLA. A explicação é que, na ausência da modulação da resposta do sistema imune à infecção no primeiro ano de vida, podem ocorrer respostas imunes altamente desreguladas a subseqüentes infecções em indivíduos susceptíveis. Estas respostas desreguladas podem iniciar a proliferação de células pré-leucêmicas na medula óssea, sendo o segundo evento necessário para o desenvolvimento da leucemia (GREAVES, 1999).

A LLA é uma doença decorrente da transformação maligna de uma célula progenitora anormal capaz de se expandir. Ainda não está esclarecido como e quando, na diferenciação normal desta célula, é desencadeada esta transformação. Sabe-se que a leucemia resulta da mutação de uma única célula-tronco (*stem cell*), cuja prole forma um clone de células leucêmicas. Com freqüência, há uma série de alterações genéticas em vez de um único evento. Os eventos genéticos que contribuem para a transformação maligna incluem a expressão inadequada de oncogenes e a perda de função de genes supressores de tumor. Os eventos causadores da leucemia são complexos e multifatoriais (MARGOLIN, STEUBER e POPLACK, 2005).

2.4 DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO

Diagnóstico e classificação precisos são essenciais para o tratamento adequado e também para o estudo da biologia da LLA pediátrica (RAIMONDI, 2000).

O exame cuidadoso da medula óssea é essencial para estabelecer o diagnóstico da LLA, porque cerca de 20% dos pacientes com leucemia aguda não apresentam blastos no sangue periférico no momento do diagnóstico (GAJJAR et al., 1995) e a morfologia dos blastos pode ser diferente no sangue periférico e na

medula. Amostras de medula óssea são conseguidas através do aspirado de medula óssea, coletado mais comumente por punção na crista ilíaca posterior. Em crianças abaixo de um ano de idade, a amostra de medula óssea é, normalmente, coletada na superfície ântero-medial da tíbia. A técnica e todo o material utilizado para a realização do procedimento devem estar devidamente esterelizados, para evitar complicações, como infecção. Ocasionalmente é necessário realizar biópsia de medula óssea, especialmente nos casos em que há fibrose medular ou necrose (RAIMONDI, 2000; MARGOLIN, STEUBER e POPLACK, 2005). Para confirmação do diagnóstico de LLA deve haver pelo menos 25% de blastos na medula óssea (SILVERMAN e SALLAN, 2003; MARGOLIN, STEUBER e POPLACK, 2005).

Para uma avaliação completa é necessário também realizar punção líquórica para investigar o envolvimento do SNC pela doença, além de radiografia de tórax, para pesquisar a presença de massa mediastinal, principalmente nas LLAs de linhagem T.

As características morfológicas, imunofenotípicas, bioquímicas, citogenéticas e moleculares das células leucêmicas confirmam que a LLA é uma doença biologicamente heterogênea. Esta heterogeneidade resulta do fato da leucemia poder se desenvolver em qualquer etapa da diferenciação linfóide normal.

A classificação precisa das leucemias agudas é biologicamente relevante. Ela deve ser prontamente reproduzível, além de ser fácil, rápida e amplamente aceita e aplicável. Outra característica desejável é permitir o mínimo possível de alterações com o tempo, para que se possam fazer comparações válidas entre diferentes grupos de pacientes. Apesar de diversas proposições, a classificação ideal para as leucemias agudas ainda não existe (BAIN, 2003).

2.4.1 Classificação Morfológica e Citoquímica

O diagnóstico e classificação da LLA iniciam-se com a análise morfológica

de Romanowsky (pelos corantes de Wright, Wright-Giemsa ou May-Grünwald-Giemsa), tanto de sangue periférico como de medula óssea. A identificação de 25% de blastos na análise da medula óssea caracteriza a LLA.

Atualmente, a classificação morfológica das leucemias agudas mais utilizada é a proposta por um grupo de hematologistas da França, dos Estados Unidos e da Grã-Bretanha, que, trabalhando em colaboração, desenvolveram a classificação Franco-Americano-Britânica (FAB) (BENNET et al., 1976). Apesar de várias críticas e sugestões para mudanças e ampliações, ainda é a única classificação de uso amplo em todo o mundo.

O grupo FAB classificou a LLA em três categorias citológicas: L1, L2 e L3 (Tabela 1).

TABELA 1. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DOS SUBTIPOS DE LLA

CATEGORIA FAB	L1	L2	L3
Tamanho da célula	Predominantemente pequeno	Grande, heterogênea	Grande, homogênea
Cromatina nuclear	Razoavelmente homogênea	Heterogênea	Homogênea
Forma nuclear	Predominantemente regular	Irregular	Regular
Núcleo	Pequeno e pouco perceptível	Geralmente visível, muitas vezes grande	Geralmente proeminente
Quantidade de citoplasma	Escassa	Variável, muitas vezes abundante	Moderadamente abundante
Basofilia citoplasmática	Leve a moderada	Variável	Forte
Vacuolização citoplasmática	Variável	Variável	Muitas vezes proeminente

Fonte: BENNET et al., 1976.

Na LLA, categoria 1 (LLA-L1) as células predominantes são pequenas, com núcleo de forma regular, cromatina razoavelmente homogênea, podendo ser

condensada em algumas células, os nucléolos são inaparentes ou pequenos e pouco visíveis. O citoplasma é escasso, com basofilia leve a moderada. Na LLA, categoria L2 (LLA-L2), os blastos são maiores e mais heterogêneos, com citoplasma moderadamente abundante e basofilia variável. Os núcleos têm formas irregulares, sendo comuns fendas e indentações, com cromatina heterogênea, nucléolos geralmente visíveis e muitas vezes grandes. Na LLA, categoria L3 (LLA-L3), as células são grandes, porém homogêneas. Os núcleos são regulares, de forma oval ou redonda, nucléolos geralmente proeminentes e cromatina homogênea, finamente pontilhada. O citoplasma é abundante, intensamente basofílico, com vacuolização, muitas vezes, proeminente. O índice mitótico é elevado.

Na infância, 70% a 80% dos casos de LLA pertencem à categoria L1; cerca de 20% dos casos de LLA pertencem à categoria L2 e apenas 1% a 2% dos casos são L3. A LLA do subtipo L3 pode ser considerada o equivalente leucêmico do linfoma de Burkitt.

Somente a análise morfológica não é suficiente para determinar a linhagem celular nos casos de leucemia aguda. Algumas reações citoquímicas são úteis podendo diferenciar a LLA da leucemia mielóide aguda (LMA).

Os blastos, na LLA, apresentam reações negativas para mieloperoxidase (MPO), cloroacetato esterase (CAE) e *Sudan black B* (SBB). Na LLA de linhagem B, a coloração com ácido periódico de Schiff (PAS) muitas vezes mostra positividade característica em blocos, o que também pode ocorrer, embora com menor frequência, nos casos de LLA de linhagem T. A LLA-L3 geralmente é PAS-negativa. Embora a coloração com PAS possa ser útil no diagnóstico da LLA, é importante reconhecer que a positividade em blocos não é, isoladamente, um dado suficiente para determinar o diagnóstico (BAIN, 2003). É comum na LLA-T forte positividade para fosfatase ácida, porém é rara na LLA de linhagem B, podendo ocorrer em alguns casos de LLA L2.

2.4.2 Classificação pela Imunofenotipagem

A imunofenotipagem, ou estudo da expressão de antígenos celulares, mediante o uso de anticorpos diretos, iniciou em meados dos anos 70 com o desenvolvimento de anticorpos policlonais contra células hematopoéticas humanas. O primeiro painel de imunofenotipagem usado incluía testes com anticorpos contra linfócitos T, imunoglobulina de cadeia leve e pesada, antígeno CALLA (*common acute lymphoblastic leukemia antigen*), moléculas de HLA-DR (*human leukocyte antigen* de classe II-DR) e a enzima nuclear TDT (*terminal deoxynucleotidyl transferase*). No final dos anos 70 foi possível identificar a linhagem celular da maioria das leucemias agudas, por meio deste painel associado a técnicas citoquímicas (SEN e BORELLA⁶, apud HEAD e PUI, 2000, p.29 ; BROUET e SELIGMANN⁷, apud HEAD e PUI, 2000, p.29; BEHM, 1996).

Com o desenvolvimento das técnicas de anticorpos monoclonais e com a distribuição comercial destes reagentes, a imunofenotipagem tornou-se, rapidamente, um método importante para o diagnóstico e classificação da leucemia aguda. Um grande número de anticorpos foi caracterizado por grupos cooperativos internacionais, e aqueles que reconheciam o mesmo antígeno foram alocados em um *cluster* de diferenciação, identificado pela sigla CD (*cluster designation*), seguida de um número. Com a conclusão do Quinto *Workshop* Internacional, 130 grupos de CD foram definidos (SCHLOSSMAN⁸, apud BEHM, 1996, p. 454).

As células leucêmicas, de diferentes tipos, expressam antígenos nucleares,

⁶ SEN, L.; BORELLA, L. Clinical importance of lymphoblasts with T markers in childhood acute leukemia. **N Engl J Med**, v. 292, p. 828-32, 1975.

⁷ BROUET, J.; SELIGMANN, M. The immunological classification of acute lymphoblastic leukemias. **Cancer**, v. 42, p. 343-62, 1978.

⁸ SCHLOSSMAN, S. F. Leucocyte Typing. Vol 5. Oxford: Oxford University Press. 1995.

citoplasmáticos e de superfície específicos. Tal característica é conhecida como imunofenótipo da célula. A determinação do imunofenótipo é chamada de imunofenotipagem e é realizada por meio de anticorpos marcados, que reconhecem epítomos específicos de antígenos celulares. A imunofenotipagem é essencial para diferenciar LLA de linhagem B da T e os casos podem ser subclassificados de acordo com a diferenciação das células (PUI et al., 1993; BAIN, 2003).

Usando o painel de anticorpos monoclonais e a presença ou ausência de imunoglobulinas no citoplasma e na superfície, a LLA é classificada em linhagem T e linhagem B. As LLAs de linhagem B correspondem a 80% a 85% dos novos casos diagnosticados de LLA e subclassificam-se em pré-B precoce, pré-B, pré-B transicional e B madura (Tabela 2). É caracterizada como comum quando expressa CD10.

2.4.2.1 LLA pré-B precoce ou pró-B

Corresponde a 60% a 65% dos casos de LLA. Os blastos da LLA pré-B precoce expressam os seguintes antígenos de superfície: CD19, CD72, CD79 e HLA-DR. Mais de 85% expressam CD22 de superfície e todos expressam CD22 citoplasmático e CD79a. Mais de 90% são TDT e CD10 positivos e cerca de 83% expressam CD34. O antígeno CD20 está presente em 55% dos casos. Em mais de 13% deste subtipo de LLA, o CD45 não é detectado ou é expresso fracamente (BEHM et al., 1992; PUI et al., 1993).

As leucemias que apresentam rearranjos envolvendo o gene *MLL*, mapeado em 11q23 (ROWLEY et al., 1990), resultantes das translocações cromossômicas t(4;11)(q21;q23), t(9;11)(p21;q23) e t(11;19)(q23;p13), geralmente são LLA pré-B precoce. Os blastos com t(4;11) normalmente expressam CD19, CD22, CD15, CD65, CD24 fraco ou ausente e CD10 negativo. Mais de 65% dos casos expressam também antígenos mielóides, como CD15 e CD65.

TABELA 2. CLASSIFICAÇÃO DA LLA PELA IMUNOFENOTIPAGEM

GRUPO	TDT	DR	CD34	CD10	CD19	CD22	CD79A	CD7	CD5	CD3	Cl Gμ	SIG μ	SIG K ou λ
PBP	++	+++	+	++	+++	+++	+++	(+)	-	-	-	-	-
PB	++	+++	+	++	+++	+++	+++	-	-	-	+++	-	-
TPB	+	+++	+	++	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	-
B	-	+++	-	+	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++
T	++	(+)	+	+	-	-	-	+++	+++	+	-	-	-

Nota: PBP = pré-B precoce; PB = pré-B; TPB = transicional pré-B; B = LLA B madura; T = LLA T; TDT = deoxinucleotidil transferase terminal; HLA-DR = *human leukocyte antigen* classe II – DR; clg μ= imunoglobulina citoplasmática de cadeia pesada μ; slg μ = imunoglobulina de superfície de cadeia pesada μ; slg κ ou λ = imunoglobulinas de superfície de cadeias leves κ ou λ; - = sem expressão do marcador; (+) = menos de 5% dos casos expressam o marcador; + = 40%-60% dos casos expressam o marcador; ++ = mais de 90% dos casos expressam o marcador; +++ = 100% dos casos expressam o marcador.

Fonte: BEHM, 1996

2.4.2.2.LLA pré-B

Aproximadamente 25% dos casos novos diagnosticados de LLA são pré-B. Praticamente todos os casos expressam CD19, CD22, CD72 e HLA-DR. Por definição, todos os casos pré-B apresentam imunoglobulinas de cadeia pesada citoplasmáticas (clg μ) sem imunoglobulinas na superfície (slg μ). Mais de 95% dos casos expressam CD10 e TDT e 61% expressam CD34 (VOLGER et al⁹, apud BEHM e CAMPANA, 2000, p. 123; PUI et al., 1993). Em contraste com as células pré-B normais da medula óssea, apenas 40% das células LLA pré-B apresentam CD20 de superfície.

Comparada com a LLA pré-B precoce, a LLA pré-B está mais associada à contagem elevada de leucócitos, níveis de desidrogenase láctica altos, menos de 51 cromossomos ou índice de DNA menor que 1.16 e as translocações cromossômicas são mais comuns. Entre 20% e 25% das LLA pré-B apresentam t(1;19)(q23;p13) ou der(19)t(1;19)(q23;p13) (PUI et al., 1993; PUI et al., 1994). Pacientes com esta translocação expressam CD19, CD22, clg μ , CD45 fortemente, CD20 fracamente ou ausente e não expressam CD34 (BOROWITZ et al., 1993; PUI et al., 1994).

2.4.2.3 LLA pré-B transicional

Blastos leucêmicos que apresentam cadeias pesadas μ no citoplasma e na superfície, sem expressar cadeias leves kappa (κ) ou lambda (λ), são considerados blastos de LLA pré-B transicional, representando transição entre os estágios pré-B e B de diferenciação (SCHIFF et al., 1991). Os blastos expressam CD10, TDT e, algumas vezes, CD34.

⁹ VOLGER, L.B. et al. Pre-B cell leukemia. A new phenotype of childhood lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**, v. 298, p. 872-78, 1978.

Corresponde a apenas 1% das LLAs e está associada à morfologia L1 ou L2, com contagem baixa de leucócitos, níveis de desidrogenase láctica baixos, raramente apresentam envolvimento de SNC e não têm uma alteração cromossômica característica (KOEHLER et al., 1993). Pacientes com LLA pré-B transicional parecem apresentar bom prognóstico.

2.4.2.4 LLA B

Em 2% a 4% das LLA pediátricas, os blastos expressam $\text{slg}\mu$ e também cadeias leves κ ou λ e são classificados como LLA-B (BEHM e CAMPANA, 2000). Existem dois tipos de LLA-B, diferentes clínica e imunofenotipicamente. O tipo mais comum caracteriza-se por morfologia L3, doença extramedular (abdominal e massas cervicais), presença de translocações cromossômicas como $t(8;14)$, $t(8;22)$ e $t(2;8)$ e blastos PAS negativos, que expressam CD19, CD22 e CD10, mas são TDT e CD34 negativos. O tipo menos encontrado de LLA-B caracteriza-se por morfologia L1 ou L2, sem doença extramedular ao diagnóstico, com blastos PAS positivo, que expressam CD34 e TDT, CD20 fraco e não estão associados a translocações do cromossomo 8 (MICHIELS et al., 1988; DEL VECCHIO et al., 1989).

O prognóstico dos pacientes com morfologia L3 e $t(8;14)$ era ruim, porém, com novos esquemas terapêuticos, a taxa de cura atual é de 70%. Entretanto, pacientes com envolvimento inicial de SNC continuam com prognóstico ruim. Pacientes com morfologia L1 ou L2 e sem $t(8;14)$ apresentam boa resposta ao tratamento (BEHM et al., 1995).

2.4.2.5 LLA T

Por definição, todos os blastos de LLA-T expressam CD7 na superfície e CD3 no citoplasma e mais de 90% expressam, no citoplasma, CD2, CD5, CD6 e TDT. Menos de 45% dos casos expressam CD1a, CD3, CD4 e CD8 na superfície.

Os blastos de LLA-T raramente expressam HLA-DR. Entre 40% e 45% expressam CD10 ou CD21. Os blastos T expressam CD45 com maior intensidade que os da linhagem B (PUI, CRIST e LOOK, 1990; PUI et al., 1993).

As tentativas de classificar a LLA-T, conforme maturação das células, não obtiveram sucesso, pois nenhuma classificação até o momento apresentou relação com prognóstico (PUI, CRIST e LOOK, 1990; SHUSTER et al., 1990). A classificação mais utilizada divide os casos em um grupo com imunofenótipos análogos àqueles dos timócitos precoces e corticais e outro grupo análogo aos timócitos maduros ou às células T.

Sexo masculino, idade maior ao diagnóstico, contagem elevada de leucócitos, envolvimento inicial de SNC, esplenomegalia, linfonomegalia, ausência de CD10 estão associados à LLA-T. Mais de 50% dos pacientes apresentam massa mediastinal. Pacientes com LLA-T apresentavam pior prognóstico se comparados com os pacientes com LLA de linhagem B, entretanto, em estudos posteriores foi evidenciado que com o uso de esquemas terapêuticos de menor duração e mais intensivos, o prognóstico dos pacientes com LLA-T é igual ao dos pacientes com LLA de linhagem B (PUI, CRIST e LOOK, 1990; STEINHERZ et al., 1998; VAN DEN et al., 1998; SILVERMAN et al., 2001).

Rego et al. (1996) analisaram a distribuição da LLA em 225 pacientes da cidade de Ribeirão Preto, dos quais 153 apresentavam menos de 15 anos de idade. Entre estes pacientes, a LLA com expressão de CD10 foi a mais frequente, representando 72,6% dos casos; 6,5% apresentavam LLA pré-B precoce, 2,6% LLA B madura, 16,4% LLA T, 1,3% LLA de linhagem mista e em 0,6% não foi possível a classificação. A diferença, em relação à literatura mundial, foi a maior proporção de pacientes com LLA B madura, principalmente quando comparada com os adultos (15,3%).

2.4.2.6 Marcadores mielóides

Em 7% a 25% dos casos de LLA existe co-expressão de marcadores mielóides, como CD13 e CD33. O significado clínico desta co-expressão é controverso. Em vários estudos houve relato de pior prognóstico dos pacientes com co-expressão de antígenos mielóides (KUREC et al., 1991; CANTU-RAJNOLDI et al., 1991; WIERSMA et al., 1991; FINK et al., 1993), enquanto outros não encontraram diferença na sobrevida dos pacientes com ou sem co-expressão destes antígenos (BRADSTOCK et al., 1989; PUI et al., 1991; LUDWIG et al., 1990 e 1993).

Uckun et al. (1997) avaliaram 1.557 crianças com diagnóstico de LLA, pesquisando a expressão de CD7, CD19, CD13 e CD33, dividindo os pacientes em LLA-B e LLA-T. A sobrevida livre de eventos, em quatro anos, foi de 77% para os casos LLA-B com co-expressão de antígenos mielóides e de 75,9% para os que não apresentavam esta co-expressão. Para LLA-T foi de 72,7% para aqueles com co-expressão e de 70,1% para os pacientes sem co-expressão de antígenos mielóides. Não houve diferença estatisticamente significativa entre estes resultados, demonstrando que a presença de antígenos mielóides não é um fator adverso para os pacientes com LLA.

Silva et al. (2004) avaliaram a co-expressão de CD13 e/ou CD33 em 84 pacientes com LLA e evidenciaram que em 26 havia co-expressão de marcadores mielóides. Neste grupo não ocorreram recidivas, enquanto que 9 pacientes recidivaram no outro grupo.

Valle et al. (2002) estudaram 102 crianças com LLA e consideraram co-expressão de marcadores mielóides quando houve presença de CD13 e/ou CD33 em mais de 10% dos blastos. O resultado foi positivo em 32 pacientes e destes, quatro apresentaram recidiva.

Putti et al. (1998) analisaram 908 casos de LLA, sendo que em 291 (32%) havia expressão de antígenos mielóides (CD11b, CD13, CD14, CD15, CD33 e CD65). CD13 e CD33 foram os mais encontrados. A sobrevida livre de eventos, em seis anos, foi de 69% para os pacientes com expressão de antígenos mielóides e de

65,3% para os que não apresentavam nenhum destes antígenos, sem diferença estatisticamente significativa. Neste estudo, a co-expressão de antígenos mielóides, na LLA, não apresentou importância no prognóstico dos pacientes.

2.4.2.7 CD45

O antígeno comum de leucócitos (CD45) é uma tirosina fosfatase, expressa em células hematopoéticas nucleadas. Estudos realizados entre 1991 e 1996 sugerem que o CD45 esteja envolvido com a regulação do crescimento e diferenciação das células hematopoéticas, assim como sua ativação de células B e apoptose (JUSTEMENT et al., 1991 e 1994; KATO et al., 1994; MELKERSON-WATSON et al., 1994; KLAUS et al., 1996). Apenas 10% das leucemias de linhagem B não apresentam níveis detectáveis de CD45 (BEHM et al., 1992). Níveis baixos de expressão de CD45 estão relacionados com prognóstico favorável, assim como outras características como contagem baixa de leucócitos, LLA de linhagem B e hiperdiploidia com mais de 51 cromossomos (BEHM et al., 1992; BOROWITZ et al., 1997).

No estudo realizado por Behm et al. (1992), foram avaliados 249 casos de LLA pediátrica. Todos os 55 casos de LLA-T e 159, dos 191 pacientes com LLA de linhagem B, apresentaram expressão de CD45, totalizando 87% dos casos. Os pacientes com CD45 negativo apresentavam contagem de leucócitos mais baixa, níveis de desidrogenase láctica menores, hiperdiploidia com mais de 50 cromossomos e índice de DNA maior que 1.15. Neste estudo, pacientes que apresentaram maior positividade do CD45, ou seja, expressão deste antígeno em 90% dos blastos ou mais, tiveram mais recidivas (30%) em relação aos outros pacientes, sendo 16% das recidivas presentes nos casos com CD45 entre 20% e 89% e 5% de recidivas nos pacientes com expressão de CD45 entre 0 e 19%.

Borowitz et al. (1997) analisaram a expressão de CD45 em 1231 crianças

com diagnóstico de LLA de linhagem B, maiores que um ano de idade. Os pacientes, cujos blastos apresentavam mais de 75% da intensidade para CD45, apresentaram sobrevida livre de eventos, em três anos, de 59%, enquanto que para os pacientes com CD45 negativo a sobrevida foi de 84%. Houve associação entre os pacientes com CD45 com mais de 75% de intensidade e presença de t(4;11) e outros rearranjos envolvendo o gene *MLL*.

Ratei et al. (1998) avaliaram a expressão de CD45 em 638 crianças com diagnóstico de LLA. Destas, 529 apresentavam LLA de linhagem B, e 109 LLA de linhagem T. CD45, considerado positivo quando presente em 20% ou mais dos blastos, foi detectado em 88,7% dos casos. Entre os pacientes com LLA de linhagem B, 12,9% não apresentavam CD45 e entre aqueles com LLA T, em 3,7% foram negativos. Não houve diferença significativa das características clínicas e sobrevida entre os pacientes com CD45 positivo ou negativo. Não houve correlação entre a expressão de CD45 e a co-expressão de antígenos mielóides.

2.4.2.8 CD34

CD34 identifica uma sialoglicoproteína transmembranosa expressa por células hematopoéticas progenitoras de todas as linhagens, células endoteliais de vênulas, células do estroma da medula óssea e células dos nervos periféricos (FINA et al., 1990; SIMMONS et al., 1991; WEISS et al., 1993). É encontrada em 1% a 5% das células normais da medula óssea (CIVIN et al.¹⁰, apud PUI et al., 1993, p. 889). Os níveis de CD34 são mais altos quanto mais imaturas as células, decrescendo conforme a maturação celular (ANDREWS et al., 1989). A maioria das leucemias

¹⁰ CIVIN, C. I. et al. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cells surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. **J Immunol**, v.133, p. 157, 1984.

são CD34 positivas, 70% das LLA de linhagem B e 30% das LLA de linhagem T expressam CD34. Na LLA de linhagem B pediátrica, a expressão de CD34 pelos blastos está associada à idade entre um ano e 10 anos, hiperdiploidia com mais de 50 cromossomos, ausência de envolvimento de SNC e prognóstico favorável (BOROWITZ et al., 1990; PUI et al., 1993).

No estudo realizado por PUI et al. (1993) foram analisadas 335 crianças com diagnóstico de LLA. Destas, 235 (70%) apresentaram blastos com expressão de CD34 (mais de 10% dos blastos positivos para CD34). A sobrevida livre de eventos, em cinco anos, foi de 83% para os casos com expressão de CD34 e de 63% para aqueles CD34 negativo, diferença estatisticamente significativa, demonstrando prognóstico favorável para pacientes CD34 positivo.

2.4.2.9 CD20

A expressão de CD20 está associada a pior prognóstico em adultos com LLA. Para avaliar se isto se confirmava na LLA pediátrica, foi realizado, em 2006, um estudo por Jeha et al., analisando 353 crianças com LLA. Destas, 169 (48%) apresentaram expressão de CD20 (considerada quando CD20 era positivo em mais de 20% dos blastos). A expressão de CD20 foi mais freqüente em pacientes entre um ano e 10 anos de idade. Nenhum dos 14 pacientes com rearranjo do gene *MLL* expressou CD20. A sobrevida livre de eventos, em cinco anos, foi de 84% para as crianças com expressão de CD20 e de 78%, para as que apresentaram CD20 negativo, sugerindo que a expressão deste antígeno não está relacionada a pior prognóstico.

2.4.2.10 CD10

Também conhecido como antígeno CALLA (*common acute lymphoblastic leukemia antigen*), é uma glicoproteína de membrana não-fosforilada, que pode ser

encontrada tanto em células normais como em células malignas. Em doenças hematoproliferativas, o CD10 é expresso na maioria das leucemias de linhagem B e em algumas de linhagem T, nos linfomas de Burkitt e alguns outros linfomas não-Hodgkin (DELIA et al., 1985). Células hematopoéticas que expressam CD10 são encontradas em pequena quantidade em tecidos fetais, como fígado e medula óssea, e também na medula óssea de crianças e adultos saudáveis (1% a 5%) (DELIA et al., 1985; RYAN et al., 1987).

Entre as LLAs de linhagem B, a expressão de CD10 é de 95% nas LLAs pré-B precoces, 98% nas pré-B e 50% nas B transicionais e B maduras (BEHM e CAMPANA, 2000). Pui et al. (1993) publicaram que entre 40% e 45% das LLAs de linhagem T expressam CD10.

A expressão de CD10, nos blastos leucêmicos, está associada a melhor prognóstico (MARGOLIN, STEUBER e POPLACK, 2005), porém alguns estudos não evidenciaram esta associação, como o realizado por Consolini et al., em 1998. Foram avaliadas 2.038 crianças com LLA, com expressão de CD10 em 95,6% dos pacientes com LLA de linhagem B e em 18,1% das LLA de linhagem T. A análise multivariada não evidenciou diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com ou sem expressão de CD10. Os pacientes considerados de alto risco apresentaram pior prognóstico que os pacientes de risco *standard*, independente da presença de CD10, com sobrevida livre de eventos, em cinco anos, de 42% para pacientes de alto risco sem CD10 *versus* 50,7% para pacientes de risco *standard* sem CD10; e de 63,6% para pacientes de alto risco com CD10 *versus* 66,8% para os de risco *standard* com expressão de CD10.

2.4.3 Classificação pela Expressão Genética

Com a identificação de várias anormalidades cromossômicas foi possível um entendimento melhor da biologia da LLA e a separação de grupos de pacientes,

conforme seu prognóstico, pela presença de determinadas alterações genéticas.

As alterações cromossômicas encontradas na LLA podem ser numéricas ou estruturais e podem ser identificadas por diferentes técnicas.

2.5 CITOGENÉTICA

Em 1914, Theodor Boveri¹¹ (apud MITELMAN et al., 1997) formulou a Teoria Mutacional do Câncer, que se baseia nas seguintes premissas: a) O câncer é uma doença celular; b) O câncer origina-se de uma única célula; c) Esta célula tem constituição cromossômica anormal, e d) a anormalidade cromossômica, que é transmitida às células descendentes, é a causa da rápida proliferação celular. No entanto, devido, principalmente, a dificuldades técnicas, esta hipótese só foi efetivamente corroborada pela descrição do cromossomo Filadélfia, quando, pela primeira vez, demonstrou-se associação efetiva entre aberração cromossômica e a neoplasia maligna, a leucemia mielóide crônica (LMC). Nos anos subseqüentes, vários estudos demonstraram que a citogenética é essencial ao diagnóstico, estadiamento, tratamento e acompanhamento de várias neoplasias, inclusive da LLA (RAIMONDI, 2000). Secker-Walker, Lawler e Hardisty (1978) foram os primeiros a evidenciar o significado prognóstico da alteração cromossômica numérica (ploidia) na LLA da infância. Em estudos subseqüentes foram relatadas várias outras alterações cromossômicas, como translocações e deleções, que também apresentam importância no prognóstico dos pacientes pediátricos com LLA (BLOOMFIELD et al¹², apud PUI, CRIST e LOOK, 1990, p. 1449; WILLIAMS et al.,

¹¹ BOVERI T. Zur frage der entstehung maligner tumoren. Jena. Germany: Verlag von Gustav Fisher, p. 1-64, 1914.

¹² BLOOMFIELD, C. D. et al. Chromosomal abnormalities in acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 4, p. 111, 1981.

1986).

As técnicas citogenéticas demonstraram a importância das alterações genéticas específicas nas células leucêmicas na transformação maligna do progenitor linfóide, no controle do crescimento e desenvolvimento destas células, auxiliando na elucidação dos mecanismos da leucemogênese.

A análise citogenética da LLA foi um desafio pela dificuldade nas técnicas de processamento dos cromossomos, com obtenção de poucas metáfases. Com a melhora dos métodos de bandeamento foram identificadas alterações cromossômicas clonais (isto é, derivadas de uma mesma célula progenitora) em 55% a 85% dos casos estudados (SECKER-WALKER et al., 1989; RAIMONDI, 1993; PÉREZ-VERA et al., 2004). Com algumas alterações no preparo das metáfases, Williams et al., em estudos publicados em 1984 e 1985, identificaram alterações cromossômicas clonais em mais de 90% dos casos de LLA.

2.5.1 Nomenclatura

A nomenclatura para descrição de aberrações cromossômicas é atualizada regularmente pelo Comitê do Sistema Internacional de Nomeclatura em Citogenética Humana (ISCN). A última atualização foi realizada em 2004 e publicada em 2005.

As anormalidades cromossômicas podem ser definidas como numéricas (ganho ou perda de cromossomos) ou estruturais. Durante a interfase, quando os cromossomos estão mais distendidos e metabolicamente ativos, eles são mais vulneráveis a variações do ambiente que provocam rupturas de sua estrutura. As aberrações estruturais dos cromossomos resultam de quebra cromossômica, seguida de fusões, em uma combinação anormal. Os rearranjos podem ser balanceados e não-balanceados.

Os rearranjos não-balanceados ocorrem quando o conjunto cromossômico possui informações a mais ou a menos.

São consideradas alterações não-balanceadas:

- deleção (del), perda de um segmento cromossômico;
- duplicação (dup), duplicação de um segmento do cromossomo;
- cromossomo em anel, quando as extremidades livres fraturadas de um cromossomo que sofreu deleção terminal se juntam;
- isocromossomo (i), duplicação completa de um braço do cromossomo com perda total do outro braço;
- cromossomo dicêntrico (dic), apresenta dois centrômeros e tende a quebrar-se na anáfase;
- translocação (t), troca de material entre dois ou mais cromossomos;

É considerada não-balanceada a translocação simples, que ocorre quando somente um cromossomo perde um segmento para outro não-homólogo (isto é, que não são iguais entre si, não formam um par) (UNIFESP, 2007; RAIMONDI, 2000).

Os rearranjos balanceados são aqueles em que o conjunto cromossômico possui o complemento normal de informações. Todas as informações genéticas estão presentes, mas de modo diferente do original. São alterações balanceadas:

- inversão (inv), quebra de um cromossomo em duas bandas, seguida de giro de 180 graus e reinserção, fazendo com que os genes fiquem em ordem inversa e;
- translocação (t) recíproca, ou seja, resulta da quebra de cromossomos não-homólogos, com trocas recíprocas de segmentos resultantes (UNIFESP, 2007).

As translocações *robertsonianas* envolvem dois cromossomos

acrocêntricos (com centrômero subterminal, cromossomos 13, 14, 15, 21 e 22) que se fundem próximos à região do centrômero com perda dos braços curtos. Um cromossomo derivativo (der) é originado por um ou mais rearranjos estruturais no mesmo cromossomo, ou envolvendo dois ou mais cromossomos. Um cromossomo marcador (mar) é um cromossomo anormal, no qual as partes não são identificadas (RAIMONDI, 2000).

Nas células tumorais, as anormalidades numéricas são consideradas clonais quando há presença adicional de um mesmo cromossomo em, no mínimo, duas células ou quando um mesmo cromossomo está ausente em, no mínimo, três células. As anormalidades estruturais são consideradas clonais quando uma mesma aberração cromossômica está presente em duas ou mais células (ISCN, 2005). O número modal é o número de cromossomos mais comum na população tumoral.

2.5.2 Técnicas para Identificação de Alterações Cromossômicas

Para identificação das alterações cromossômicas, uma das técnicas utilizadas é a citogenética convencional (CC), que analisa microscopicamente os cromossomos de células em metáfase. Outras técnicas utilizadas para identificar alterações cromossômicas são citometria de fluxo (FC), hibridização fluorescente *in situ* (FISH), cariotipagem por espectro colorido (SKY), reação em cadeia por polimerase reversa (PCR) e hibridização genômica comparativa (CGH). Estes métodos são capazes de detectar alterações não identificadas pela CC e são complementares a esta, aumentando a resolução de identificação de várias anormalidades cromossômicas presentes na LLA da criança (DU MANOIR, 1993; KAMIHIRA et al., 1994; SCHROCK et al., 1996; PAJOR et al., 1998; RAIMONDI, 2000; NORDGREN et al., 2002).

2.5.2.1 Citogenética Convencional (CC)

A citogenética convencional é o método tradicional para identificação de alterações cromossômicas e também para avaliação da ploidia das células leucêmicas. Embora permaneça como o único procedimento capaz de possibilitar a avaliação conjunta de todo o genoma, infelizmente, na LLA, existe maior dificuldade para identificação de anormalidades cromossômicas clonais, pela baixa qualidade das metáfases e o baixo índice mitótico encontrado nas culturas. Desta maneira, algumas células anormais não são identificadas pelo número pequeno de metáfases analisadas, assim como algumas alterações menores, pela qualidade ruim das metáfases. Muitas vezes o resultado final é dado como normal, porém, existem alterações menores que não foram identificadas. Em condições consideradas ótimas podem ser detectados clones cariotipicamente anormais em 55% a 90% dos pacientes com LLA (SECKER-WALKER, 1989; PUI, CRIST e LOOK, 1990; RAIMONDI, 1993; HEIM AND MITELMAN, 1995 e PÉREZ-VERA et al., 2004). Para ser considerado um exame normal, representativo, devem ser avaliadas pelo menos 20 metáfases e nenhuma alteração cromossômica pode ser encontrada (ISCN, 2005).

A técnica para realização da CC consiste de cultura com preparação citológica, bandeamento cromossômico GTG (bandas G por tripsina usando Giemsa) e análise dos cromossomos metafásicos.

a) Cultura e preparação citológica: a medula óssea coletada é inoculada em dois frascos de cultura celular, contendo meio RPMI 1640-Gibco, em meio estéril, no fluxo laminar. Este material é suplementado com 20% de soro bovino fetal e incubado em estufa por 24 horas a 37° C. Após este período, o protocolo de preparação citológica segue três etapas principais: interrupção mitótica, quando se adiciona 0,1 ml de colchicina (Sigma - 16 ug/ml) na cultura, que é mantida a 37° C por 40 minutos; tratamento hipotônico com solução de cloreto de potássio (KCl a 0,75M, a 37° C por 20 minutos) e fixação do material com 3 volumes de metanol para 1 ácido acético glacial recém-preparado. São distribuídas, então, duas gotas da

suspensão em lâminas e, após a secagem em temperatura ambiente, as lâminas são armazenadas em estufa a 37° C, para obtenção das bandas G (VEIGA, 2003).

b) Bandejamento Cromossômico GTG: o material é desidratado em soluções decrescentes de álcoois (96%, 85%, 70%) e posteriormente hidratado em tampão fosfato com pH de 6,8 por 5 minutos. A seguir, as lâminas são imersas em solução de tripsina a 0,02% e coradas em solução de Giemsa diluída em tampão fosfato a 0,06M (14,2 g/l de NaHPO₄ + 8,16 g/l de KH₂PO₄), com pH de 6,8, na proporção de 1:30, durante 5 minutos. Após este processo, as lâminas são lavadas com água destilada e secadas em temperatura ambiente (VEIGA, 2003; JAMUR, 2005).

c) Análise: após a coloração convencional, em Giemsa, os cromossomos metafásicos são contados, diretamente ao microscópio, para estabelecer o número modal. Cada par de cromossomos cora-se num padrão típico de bandas claras e escuras. Posteriormente, procede-se ao bandejamento GTG e, sempre que possível, um mínimo de 20 metáfases bandeadas são analisadas, em desenhos e fotografias, para a identificação da presença ou ausência de aberrações cromossômicas (VEIGA, 2003; JAMUR, 2005), o que também pode ser feito por um sistema computadorizado que propicia uma análise muito mais ágil.

2.5.2.2 Hibridização fluorescente *in situ* (FISH)

É uma técnica de citogenética molecular sensível que utiliza sondas fluorescentes de DNA para detectar aberrações cromossômicas específicas (MARK, 1997). Os três tipos de sondas mais utilizadas são centroméricas, loco específica e sondas de cromossomos inteiros. Sondas centroméricas são usadas para numeração de cópias de cromossomos, enquanto as sondas loco específicas são utilizadas para detectar a presença de um gene específico. As sondas que colore o cromossomo inteiro consistem de múltiplas seqüências descontínuadas de DNA no

mesmo cromossomo, que são usadas para colorir todo o cromossomo. Estes tipos de sonda são utilizadas em combinação de uma ou mais cores diferentes, simultaneamente, o que facilita a visualização subsequente (MARK, 1996). Quando se usam as sondas centroméricas, algumas alterações estruturais podem não ser detectadas se o segmento do cromossomo onde elas se encontram não está sendo avaliado por esta determinada sonda. Nesses casos, as sondas de cromossomos inteiros são muito úteis para identificar estas anormalidades estruturais, colorindo todo o cromossomo ou segmentos de cromossomos em cores diferentes.

Uma grande vantagem da técnica FISH é que tanto os cromossomos em metáfase quanto os núcleos em intérfase (não-mitóticos) podem ser analisados com sondas obtidas de seqüências específicas de cromossomos. Esta técnica é uma complementação muito importante para a CC por conseguir identificar aberrações que não são por ela detectadas. É útil também na pesquisa de doença residual mínima, assim como para identificar o envolvimento de linhagens de células diferentes nas leucemias agudas.

2.5.2.3 Citometria de Fluxo (FC)

É um método rápido que fornece uma estimativa do conteúdo de DNA, sem necessidade de cultura de células, avaliando ganho ou perda de cromossomos nas células em intérfase. No entanto, quando ocorre ganho ou perda de apenas um ou dois cromossomos, esta técnica só conseguirá identificá-los dependendo do tamanho dos cromossomos envolvidos (PAJOR et al., 1998).

Sua maior vantagem é a rapidez para identificar hiperdiploidia alta (51 a 65 cromossomos) (NYGAARD et al., 2006).

2.5.2.4 Cariotipagem por espectro colorido (SKY)

É uma técnica de citogenética molecular baseada na hibridização de 24

sondas coloridas de cromossomos humanos diferentes, que permitem a identificação simultânea de 22 pares de cromossomos autossômicos e também dos cromossomos sexuais, cada um em cor diferente na mesma metáfase. O nível de resolução das inserções e translocações nas metáfases provenientes dos linfócitos, estimado para o método SKY, é de aproximadamente 1 *megabasepair* (Mpb) (SCHROCK et al., 1996).

As células leucêmicas são sensíveis à cariotipagem com múltiplas cores por apresentarem aberrações cromossômicas de grande complexidade (NORDGREN et al., 2002). Através do SKY há melhora importante na análise cariotípica de casos com hiperdiploidia e com morfologia ruim dos cromossomos, cuja avaliação é inadequada pela CC.

2.5.2.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O desenvolvimento deste método transformou a tecnologia molecular. A PCR consiste em produzir, automaticamente, milhões de cópias de um único segmento de DNA em questão de horas. Depende da ação de polimerases do DNA, enzimas copiadoras de DNA, sobre nucleosídeos trifosfatados de adenina, timina, citosina e guanina, e *primers*, a partir dos quais serão sintetizadas as novas fitas de DNA. Esta técnica é 400 a 4000 vezes mais sensível que análise por *Southern blot* com a possibilidade de detectar uma célula leucêmica em 100.000 a 1.000.000 de células normais da medula óssea. É possível detectar também pontos de quebra isolados em grandes regiões genômicas usando PCR de cadeia longa (WILLIS et al., 1997). A disponibilidade das informações das seqüências de DNA em um número cada vez maior de genes de fusão tem resultado em protocolos de PCR para várias translocações individuais (HARRISON, 2001).

Este método tem a vantagem de utilizar pequenas quantidades de material, as células não precisam estar em divisão para serem analisadas e é extremamente

sensível para detectar células anormais, mesmo que raras (HARRISON, 2001).

2.5.2.6 Reação em cadeia da Polimerase com transcrição reversa (RT-PCR)

Técnica que permite a amplificação de um determinado segmento de RNA. Este é primeiramente transcrito reversamente em DNA complementar, para que possa, então, ser realizada a PCR. Os RNA mensageiros transcritos a partir de genes de fusão nos locais de rearranjo cromossômico, originam marcadores específicos de tumor adequados para amplificação por PCR.

Entretanto, como a PCR é uma reação específica para um rearranjo genético individual, considerando que existe um grande número de genes de fusão e pontos de quebra nas células tumorais, são necessárias numerosas reações por PCR ou a abordagem multiplex para conseguir detectar todos os rearranjos associados a LLA (PALLISGAARD et al., 1998).

2.5.2.7 PCR real-time

Também chamada de PCR quantitativa *real-time* (QRT-PCR) ou PCR cinética, esta é uma técnica que amplifica e quantifica, simultaneamente, partes específicas de DNA. É utilizada para determinar se uma sequência específica está presente na amostra, e se está presente, é capaz de identificar qual o número de cópias (KUBISTA et al., 2006). Este método é usado para detectar, rapidamente, a presença de anormalidades genéticas.

2.5.2.8 Hibridização genômica comparativa (CGH)

É um método sensível, baseado em hibridização fluorescente *in situ* com *screening* de todo o genoma para detecção de áreas dos cromossomos com alterações menores que 3 Mbp, e representativas, se presentes em mais de 20% a

30% das células analisadas (KIRCHHOFF et al., 1999). Não depende da atividade mitótica das células, podendo detectar ganhos e perdas de cromossomos inteiros (trissomias e monossomias), assim como duplicações parciais e deleções de braços de cromossomos originadas de rearranjos não-balanceados (DU MANOIR et al., 1993). Não é capaz de detectar aberrações cromossômicas balanceadas, como as translocações.

Esta técnica tem sido muito utilizada na análise de tumores sólidos, dos quais é difícil a obtenção de mitoses para análise e os cariótipos são altamente complexos e difíceis de interpretar.

Vários estudos foram realizados comparando os resultados conseguidos com a citogenética convencional com os das outras técnicas complementares.

Em 1997, foi publicado por Kharu et al., da Finlândia, estudo comparando as alterações cromossômicas encontradas em 13 pacientes com diagnóstico de LLA pelos métodos de CC e CGH. Em cinco pacientes os resultados das duas técnicas foram iguais, sendo encontrada alteração cromossômica em um caso e os outros quatro sem aberrações identificadas. Em sete pacientes houve discrepância dos resultados entre as duas técnicas. Em um houve suspeita de alteração pela CC que não foi confirmada pela CGH. Nos outros seis casos o resultado foi normal pela CC ou não houve metáfases, e pela CGH foram vistas várias trissomias e, em um caso presença de cromossomo marcador. A CGH mostrou-se útil como método complementar à CC, sendo suas principais vantagens: a detecção de hiperploidia e aberrações cromossômicas específicas, nos casos em que as metáfases das células leucêmicas são difíceis de serem obtidas; o fato dos cariótipos complexos e da origem dos cromossomos marcadores poderem ser identificados; e a possibilidade de realizar a avaliação, mesmo em material congelado ou fixado.

Em um estudo realizado em 2002 por Nordgren et al., na Suécia, foram avaliadas 70 crianças com LLA utilizando as técnicas de CC, FISH e SKY para detectar as alterações cromossômicas. Foram identificadas alterações estruturais e

numéricas em 80% dos pacientes com o uso das técnicas de FISH e SKY, enquanto que, quando realizada somente a CC, as alterações foram encontradas em apenas 60% dos pacientes. Utilizando todas as técnicas, foram detectadas 106 aberrações cromossômicas, enquanto somente com a CC, foram identificadas apenas 34 alterações. Em 12 casos foram detectadas alterações cromossômicas de pior prognóstico que não tinham sido observadas pela CC. Comparadas com a CC, a técnica SKY forneceu informações adicionais em 52% dos casos e a análise por FISH em 47% dos casos, comprovando a importância da complementação da avaliação por CC com outros métodos.

Kristensen et al., na Dinamarca, publicaram, em 2003 um estudo com 145 pacientes entre um e 14,9 anos de idade, com diagnóstico de LLA-T e detectaram alterações cromossômicas por meio dos métodos de CC, CGH, CGH de alta resolução e PCR. Através da CGH de alta resolução foram encontradas 405 alterações cromossômicas em 87% dos pacientes e com a CC foram identificadas alterações em 64% dos casos, evidenciando a importância de métodos complementares à CC para melhor identificação das aberrações cromossômicas.

Em 2004, Pérez-Vera et al., estudaram, no México, 100 crianças com LLA e em todos os casos foi realizada CC e FC. Os resultados foram iguais nos dois métodos em 86% dos pacientes. Em 14 casos os resultados foram discrepantes, em nove foi identificada hipodiploidia apenas pela CC e em cinco, hiperdiploidia de 51 a 65 cromossomos apenas pela FC, evidenciando que a FC é uma boa técnica para avaliar hiperdiploidia. Porém, para melhores resultados devem ser usados outros métodos complementares a estes.

Woo et al., da Coreia, publicaram, em 2005, o resultado da análise de 65 crianças com LLA utilizando CC e FISH. Rearranjos genéticos foram identificados em 73,8% dos casos com a combinação do FISH com a CC e, em 49,2%, apenas com CC. Dos 33 pacientes com cariótipo normal ou sem obtenção de metáfases, foram detectadas alterações cromossômicas através do FISH. Este método é capaz

de fornecer informações importantes no prognóstico das crianças com LLA (Tabela 3).

TABELA 3. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE VÁRIOS ESTUDOS EM RELAÇÃO A PORCENTAGEM DE ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS IDENTIFICADAS PELOS MÉTODOS DE CC, FISH, CGH E SKY

AUTOR	ANO DE PUBLICAÇÃO	NÚMERO DE PACIENTES	CC	FISH	CGH	SKY
Karhu et al.	1997	13	38,4%	-	84,6%	-
Nordgren et al.	2002	70	60%	80%	-	80%
Kristensen et al.	2003	145	64%	-	87%	-
Woo et al.	2005	65	49,2%	73,8%	-	-

Em 2006, Nygaard et al. (Suécia), utilizaram FC, CC e CGH para detectar hiperdiploidia em 60 crianças com LLA. Neste estudo, 89% dos pacientes com hiperdiploidia entre 51 e 65 cromossomos foram identificados através da CC. Houve associação estatisticamente significativa entre os três métodos, apesar de que, em quatro pacientes, a hiperdiploidia não foi detectada pela CC nem pela CGH e, em dois casos que apresentavam hiperdiploidia entre 51 e 65 cromossomos pela CC e pela CGH, isto não foi confirmado pela FC. Torna-se evidente que, principalmente na LLA, é necessário mais de um método para identificação das alterações cromossômicas.

2.5.3 Alterações Cromossômicas

A análise citogenética da LLA inicialmente foi um desafio porque havia muita dificuldade para identificar as metáfases de células leucêmicas pelas técnicas utilizadas. Com a melhora dos métodos, investigadores conseguiram detectar anormalidades cromossômicas clonais em 55% a 80% dos casos, conforme artigos

publicados de 1982 a 1989 (WILLIAMS et al.¹³, apud PUI, CRIST e LOOK, 1990, p. 1449; CARROL et al., 1987; UCKUN et al., 1989; FLETCHER et al., 1989). Outros estudos foram publicados a partir de 1990, demonstrando pouca alteração nesta porcentagem, 75% a 90% (SECKER-WALKER, 1990; RAIMONDI, 1993). As anormalidades cromossômicas podem ser numéricas ou estruturais e, com frequência, os cariótipos na LLA apresentam os dois tipos de alterações.

2.5.3.1 Alterações Numéricas

A LLA pode ser classificada em cinco subtipos, baseando-se no número modal de cromossomos: hiperdiploidia, quando a célula apresenta 47 a 50 cromossomos; hiperdiploidia com mais de 50 cromossomos; pseudodiploidia, blastos com 46 cromossomos e alterações estruturais; diploidia, semelhante à célula normal de origem, ou seja, 46 cromossomos, sem anormalidades estruturais, e hipodiploidia, quando são observados menos de 46 cromossomos. O reconhecimento da ploidia como uma característica citogenética na LLA melhorou a habilidade de prever o prognóstico e de orientar a escolha terapêutica (RAIMONDI, 1993).

2.5.3.1.1 Hiperdiploidia com mais de 50 cromossomos

Inclui os casos de *near*-tetraploidia (82 a 94 cromossomos), *near*-triploidia (69 a 81 cromossomos) e hiperdiploidia de 51 a 68 cromossomos.

Pacientes com hiperdiploidia entre 51 e 68 cromossomos representam 25% a 30% das crianças com LLA e têm características clínicas favoráveis e melhor

¹³ WILLIAMS, D. L. et al. Prognostic importance of chromosome number in 136 untreated children with acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, New York, v. 60, p. 864, 1982.

resposta ao tratamento do que aqueles que têm blastos com outras alterações numéricas. As características comumente associadas à hiperdiploidia são cor branca, idade entre dois e 10 anos, contagem inicial de leucócitos baixa, ausência de células T, LLA pré-B precoce e expressão de CD10 (WILLIAMS et al., 1982; PUI et al., 1989; RAIMONDI, 1993). O ganho do cromossomo 21 é a anormalidade mais comum na LLA, ocorrendo em aproximadamente 20% dos casos com alteração citogenética e em mais de 90% dos casos com hiperdiploidia com mais de 50 cromossomos (FORESTIER et al., 2000; PAULSSON et al., 2005). Quando a trissomia do cromossomo 21 é a única alteração encontrada, ela está associada a um prognóstico favorável (RAIMONDI et al., 1992). Outras trissomias que também são encontradas freqüentemente envolvem os cromossomos 4, 6, 10, 14, 17, 18, 20 e o cromossomo X. Investigadores do *Pediatric Oncology Group* (POG) relataram que, em pacientes com hiperdiploidia com mais de 53 cromossomos, aqueles que apresentavam trissomias dos cromossomos 4 e 10 tiveram prognóstico melhor (HARRIS et al., 1992; MARTIN et al., 1996). Pode ocorrer também duplicação de 1q e do isocromossomo 17q em alguns casos (WILLIAMS et al., 1982; PRIGOGINA et al., 1988). Pacientes que apresentam apenas alterações numéricas têm um prognóstico melhor do que aqueles que também têm anormalidades estruturais. Uma possível explicação para isto é que as alterações estruturais ocasionem uma proporção aumentada de mutações nas células somáticas, que podem estar relacionadas ao desenvolvimento de resistência aos quimioterápicos (PUI et al., 1989; RAMOS et al., 2000).

A hiperdiploidia com mais de 50 cromossomos é um dos fatores mais confiáveis de melhor prognóstico. A base biológica ainda não está clara, porém algumas hipóteses têm sido propostas. Uma delas é que estes pacientes apresentam porcentagem maior de células na fase S de divisão celular, resultando em sensibilidade maior aos quimioterápicos ciclo celular específicos. Outra sugestão está relacionada ao maior acúmulo de metotrexato e seus poliglutamatos nas células

leucêmicas com hiperdiploidia, com conseqüente redução na expressão do transportador de folato, tornando as células leucêmicas mais sensíveis aos antimetabólitos. A terceira possibilidade é que as células leucêmicas, hiperdiploides, sejam mais propensas à apoptose (LOOK et al., 1982; WHITEHEAD et al., 1992; KASPERS et al., 1995; BELKOV et al., 1999 e ITO et al., 1999).

Pui et al. (1989) avaliaram 582 crianças com diagnóstico de LLA, das quais foram obtidos 519 resultados satisfatórios da CC. Foi encontrada hiperdiploidia em 138 pacientes. Em 62% destes casos, foram detectadas também alterações cromossômicas estruturais. De 28 casos que não responderam ao tratamento, 22 apresentavam alterações cromossômicas estruturais, mostrando associação significativa destas alterações com falha do tratamento.

Raimondi (2000) estudou 182 crianças com LLA apresentando hiperdiploidia com 51 a 67 cromossomos. Em 46% dos casos foram detectadas apenas alterações numéricas e, nos demais, houve associação de alterações numéricas e estruturais. A trissomia do cromossomo 21 foi a mais comum, presente em 97% dos casos, seguida das trissomias dos cromossomos 6 (86%), X (81%), 14 (80%), 4 (76%), 18 (68%), 17 (68%), 10 (56%), 8 (34%) e 5 (26%). As alterações estruturais mais comuns foram duplicação de 1q (14%) e isocromossomo 17q (5%). Neste estudo, não houve diferença em relação ao prognóstico em pacientes com células hiperdiploides com ou sem anormalidades estruturais.

Zemanova et al. (2005) estudaram 107 crianças com LLA, utilizando CC e FISH para análise citogenética. Em 43% dos pacientes foi encontrada hiperdiploidia com mais de 50 cromossomos. Alterações cromossômicas estruturais foram identificadas em 22% dos casos, sendo as mais comuns a duplicação do braço longo do cromossomo 1, dup(1)(q), e a deleção do braço longo do cromossomo 6, del(6)(q). Nesse estudo, os pacientes com células hiperdiploides que apresentaram alterações cromossômicas tiveram pior prognóstico.

Nygaard et al. (2006) analisaram 92 crianças com LLA mediante CC, FC e

CGH para detecção de hiperdiploidia com mais de 50 cromossomos. A hiperdiploidia foi um indicador de bom prognóstico. Os pacientes com trissomia do cromossomo 5 e presença de isocromossomo 17 tiveram pior prognóstico enquanto que aqueles com trissomias dos cromossomos 6, 4, 10, 17 e 18 evoluíram melhor.

2.5.3.1.2 *Near-triploidia e near-tetraploidia*

Casos de LLA pediátrica com *near-triploidia* (69 a 81 cromossomos) são raros, cerca de 0,3%. Até 1990, tinham sido descritos apenas 7 casos em crianças com LLA (OHTAKI et al., 1985 e PUI et al., 1990). Por ser uma condição incomum, ainda é incerto se pacientes com 69 a 81 cromossomos devem ser considerados como uma entidade clínica e biológica diferente dos outros casos de hiperdiploidia com mais de 50 cromossomos.

A *near-tetraploidia* (82 a 94 cromossomos) corresponde a menos de 1% dos casos de LLA pediátrica e seu prognóstico é incerto. Em todos os casos descritos foi relatado ganho do cromossomo 21. Acredita-se que os casos de *near-tetraploidia* originam-se de endorreduplicação, pois em alguns casos são encontrados pares de cromossomos com os mesmos rearranjos ou deleções.

Os casos com *near-tetraploidia* estão associados a morfologia L2 em 30% dos casos, imunofenótipo T em 47%, presença de marcadores mielóides na imunofenotipagem (CD13, CD15 e CD33) em aproximadamente 40% e ocorrem em pacientes com idade maior ao diagnóstico (média de 8,6 anos) quando comparados àqueles com LLA com outras alterações cromossômicas numéricas.

Em um estudo colaborativo realizado pelo *St. Jude Children's Hospital* e Grupo Cooperativo de Leucemia Infantil Europeu, aproximadamente 5,9% de 169 crianças com LLA apresentavam *near-tetraploidia* e 0,6% *near-triploidia* (RAYNAUD et al., 1999).

Raimondi et al. (2006) publicaram um estudo avaliando 620 crianças com

LLA, com análise citogenética por CC e FC. Foi detectada *near*-triploidia em quatro pacientes (0,6%) e *near*-tetraploidia em 14 (2,2%). Não houve diferença estatisticamente significativa em relação à idade, contagem de leucócitos e características imunofenotípicas entre os pacientes com *near*-triploidia e aqueles com *near*-tetraploidia. Também não houve diferença em relação ao prognóstico, quando estes pacientes foram comparados aos que apresentaram hiperdiploidia com mais de 50 cromossomos. De acordo com estas observações, os autores sugerem que pacientes com *near*-triploidia, *near*-tetraploidia e LLA de linhagem B podem ser incluídos no protocolo de tratamento de baixo risco. Como neste estudo houve pequeno número de pacientes com LLA-T, a recomendação não pode ser estendida a estes pacientes, que em outros estudos apresentaram pior prognóstico, com recidivas e óbitos (PUI, CRIST e LOOK, 1990).

2.5.3.1.3 Hiperdiploidia de 47 a 50 cromossomos

Corresponde de 10% a 15% dos casos de LLA infantil e, inicialmente, era considerada como de prognóstico intermediário (WILLIAMS et al., 1982; BLOOMFIELD et al., 1989; SECKER-WALKER et al., 1989). Podem ser encontradas trissomias de quase todos os cromossomos, sendo os mais comuns as dos 8, X, 10 e 21. A trissomia do cromossomo 21 está presente em 30% das LLAs de linhagem B com hiperdiploidia entre 47 e 50 cromossomos (FORESTIER et al., 2000; PAULSSON et al., 2005).

Raimondi et al. (1992) analisaram 86 casos com 47 a 51 cromossomos. A trissomia do cromossomo 21 foi a mais comum, encontrada em 34 casos, seguida das trissomias dos cromossomos X, em 18; do 8, em oito; e do 10, em sete pacientes. As regiões cromossômicas mais comumente envolvidas nas alterações estruturais (encontradas em 76% dos casos) foram 1q (13 pacientes), 6q (12), 12p (18) e 19p (9). A evolução destes pacientes foi boa, com sobrevida livre de eventos,

em quatro anos, de 77% \pm 11%.

2.5.3.1.4 Pseudodiploidia

Caracteriza-se por um número de cromossomos de 46 por célula, porém, com anormalidades estruturais, principalmente translocações. Corresponde a aproximadamente 40% dos casos de LLA pediátrica, sendo o maior grupo em relação à ploidia. As alterações estruturais mais comuns envolvem o braço curto do cromossomo 12, em 10% a 12% dos casos, e a translocação mais encontrada é a t(1;19)(q23;p13), em 5% a 6% dos pacientes. Os blastos pseudodiploides estão associados à contagem inicial de leucócitos elevada e nível alto de desidrogenase láctica. O prognóstico neste grupo era muito ruim até o desenvolvimento da quimioterapia com múltiplas drogas. Atualmente, pode se esperar resposta semelhante à de leucemias dos outros grupos desde que os pacientes com pseudodiploidia sejam tratados com regimes terapêuticos intensificados (WILLIAMS et al., 1982; FLETCHER et al., 1989; LAMPERT et al., 1991; RIVERA et al., 1991; RUBIN et al., 1991). Algumas translocações, como t(9;22), t(4;11) e t(8;14), são exceções que, independentemente do esquema de tratamento, continuam representando pior prognóstico, com doença altamente resistente aos quimioterápicos.

2.5.3.1.5 Diploidia

A incidência de casos em que não se encontram alterações citogenéticas varia muito, em parte, porque a morfologia dos cromossomos nas metáfases dos blastos leucêmicos é de difícil avaliação. É comum não se detectar anormalidades cromossômicas pela CC em cerca de 10% a 15% de grandes séries de pacientes com LLA. Mais de 30% dos pacientes com LLA T apresentam cariótipo normal. Para que se possa considerar como normal, no mínimo 20 metáfases precisam ser

analisadas e nenhuma alteração pode ser encontrada. Em muitos dos casos, considerados normais, o que pode ocorrer é que a qualidade das metáfases seja ruim, impossibilitando a detecção de pequenos rearranjos cromossômicos ou alterações genéticas submicroscópicas, ou que os clones sejam mitoticamente inativos. Em muitos casos, para melhorar a qualidade da análise é necessário o uso de técnicas de genética molecular. A translocação t(12;21)(p13;q22), por exemplo, não é, habitualmente, identificada pela CC (ZEN et al, 2004).

2.5.3.1.6 Hipodiploidia

É encontrada em 7% a 8% dos casos de LLA infantil e caracteriza-se pela presença de menos de 46 cromossomos. Subdivide-se em três categorias: 41-45 cromossomos, 30-40 e menos de 30 (*near*-haploidia). Mais de 80% dos casos apresenta 45 cromossomos, o que ocorre pela perda de um cromossomo inteiro, translocações não balanceadas ou pela formação de cromossomos dicêntricos. A monossomia do cromossomo 20 é a mais freqüente e, muitas vezes, é a única anormalidade encontrada. Blastos com hipodiploidia têm alta freqüência de translocações cromossômicas, comparáveis àquelas encontradas associadas à pseudodiploidia.

Pui et al. (1987) analisaram 409 crianças com LLA, sendo que 31 (7,6%) delas apresentavam hipodiploidia. A distribuição do número modal de cromossomos foi de 45 em 26 casos, 28 em dois, 26, 36 e 43, em um paciente cada. A hipodiploidia resultou da perda de um cromossomo inteiro em 20 pacientes, de translocações não balanceadas em sete e de cromossomos dicêntricos em quatro casos. Em nove pacientes foi detectada monossomia do cromossomo 20, sendo a única anormalidade em três deles.

Por haver um número limitado de relatos de pacientes com hipodiploidia, são necessários mais estudos para definir o prognóstico, apesar de alguns estudos

demonstrarem que estes pacientes apresentam evolução pior (PUI et al., 1987; HEEREMA et al., 1999; RAIMONDI et al., 2003; CHARRIN et al., 2004).

2.5.3.2 Alterações Estruturais

No primeiro *Workshop* de Morfologia, Imunologia e Citogenética (MIC), foi relatado que 66% dos casos de LLA, considerando adultos e crianças, apresentavam, no mínimo, uma alteração cromossômica, em associação com características específicas de imunofenotipagem (*First MIC Cooperative Study Group*¹⁴, apud PUI, CRIST e LOOK, 1990, p.1451). Em 1987, foram reconhecidas, na Nona Conferência de Mapeamento do Genoma Humano (HMG), trinta aberrações cromossômicas na LLA, sendo mais seis alterações estruturais descritas no *Workshop* seguinte, em 1989 (BLOOMFIELD et al., 1987; TRENT et al., 1989). Até 1999, mais de 200 alterações cromossômicas clonais foram identificadas e mais de 50 anormalidades moleculares descritas (GREAVES, 1999).

As alterações cromossômicas mais comuns e que apresentam maior impacto no prognóstico da LLA são as translocações t(1;19), t(12;21), t(9;22), t(4;11) e as anormalidades no braço longo do cromossomo 6 (6q) e no braço curto dos cromossomos 9 e 12 (9p e 12p). Na LLA-T são encontradas alterações específicas que não têm, ainda, valor prognóstico comprovado.

2.5.3.2.1 t(9;22)(q34;q11) - Cromossomo Filadélfia

Esta translocação foi descrita pela primeira vez por Nowell e Hungerford

¹⁴ First MIC Cooperative Study Group: Morphologic, immunologic, and cytogenetic (MIC) working classification of acute lymphoblastic leukemias. Report of the workshop held in Leuven, Belgium, April 22-23, 1988. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 23, p. 189, 1986.

em 1960, que relataram a associação da leucemia mielóide crônica com um “cromossomo diminuto” anormal, inicialmente chamado de cromossomo Filadélfia (Ph), por causa da cidade onde foi descoberto (NOWELL et al.¹⁵, apud PUI, CRIST e LOOK, 1990, p.1451). Originalmente, pensava-se que esta alteração estava associada apenas à leucemia mielóide crônica (LMC), mas mesmo antes do desenvolvimento das técnicas de bandeamento cromossômico, em 1970, já se identificava o cromossomo Ph em LLA (HEIM E MITELMAN, 1995), estando presente em 3% a 5% das crianças com LLA (RIBEIRO et al., 1987; CRIST et al., 1990).

Algumas características associadas à t(9;22) são idade maior ao diagnóstico, contagem inicial de leucócitos elevada, porcentagem alta de blastos no sangue periférico, blastos de morfologia L2, comprometimento de SNC no diagnóstico e cariótipo com pseudodiploidia (PRIEST et al., 1980; CRIST et al., 1990). A maioria dos blastos com cromossomo Filadélfia são de linhagem B, apesar de também ocorrer em alguns casos de LLA-T e de LLA de fenótipo misto (CRIST et al., 1990; SCHLIEBEN et al.; 1996).

Vários estudos evidenciaram que esta translocação confere pior prognóstico (BLOOMFIELD et al., 1989; CRIST et al., 1990; FLETCHER et al., 1991 e 1992). Pacientes com presença de Ph associada à monossomia do cromossomo 7 apresentam sobrevida ainda menor que aqueles somente com Ph (RUSSO et al., 1989). Estudos sugerem que tratamento com transplante de medula óssea possa aumentar a sobrevida de pacientes com esta translocação (FORMAN et al., 1987; CRIST et al., 1990).

Fletcher et al. (1991), analisando 434 crianças com diagnóstico de LLA,

¹⁵ NOWELL, P.C.; HUNGERFORD, D.A. A minute chromosome in human granulocytic leukemia. **Science**, v.132, p. 1497, 1960.

observaram a t(9;22) em 15 pacientes (3,5%). Três crianças não entraram em remissão da doença após tratamento de indução e dos 12 pacientes que atingiram remissão completa, nove recidivaram. A sobrevida global, em quatro anos, foi de 20,4% nos pacientes com cromossomo Ph e de 88,2% nos pacientes sem esta translocação.

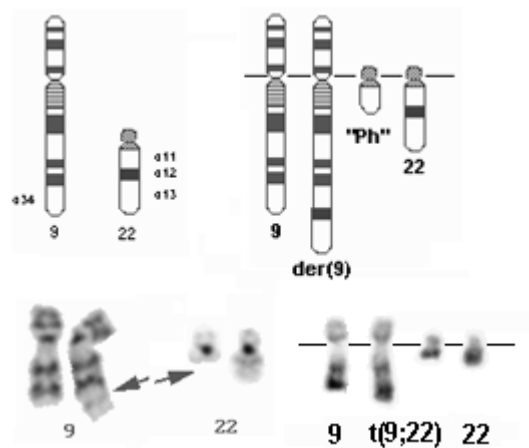
Heerema et al. (2004) analisaram 249 crianças com diagnóstico de LLA e presença de cromossomo Ph, provenientes de 10 grupos cooperativos e instituições médicas. Foram encontradas aberrações cromossômicas secundárias em 153 pacientes (61%), sendo as mais comuns a perda de 9p, monossomia do cromossomo 7 e hiperdiploidia (entre 51 e 64 cromossomos). A sobrevida livre de eventos, em cinco anos, para os 249 pacientes foi de 26,3 % e a sobrevida global de 37,2%. Quando foram analisados apenas os 206 pacientes com remissão, após tratamento de indução inicial, a sobrevida livre de doença foi de 31,2%. A recidiva foi a causa mais comum de falha no tratamento. Pacientes com associação da t(9;22) com monossomia do cromossomo 7 e anormalidades do 9p apresentaram pior prognóstico. Crianças com hiperdiploidia e cromossomo Ph tiveram melhor prognóstico quando comparadas àquelas com alterações nos cromossomos 7 e 9. A sobrevida livre de eventos, em cinco anos, foi de 34,3% para os pacientes com cromossomo Ph e mais de 50 cromossomos, e de 14% para as crianças com alterações nos cromossomos 7 e 9.

Citogeneticamente, o cromossomo Ph, na LLA, é idêntico ao encontrado na LMC. Uma diferença entre as duas entidades é que este marcador pode permanecer nas células da medula óssea de pacientes com LMC durante todo o curso da doença, enquanto na LLA, quando a criança encontra-se em remissão hematológica completa, o cromossomo Ph não é mais visualizado na análise citogenética (RIBEIRO et al., 1987; CRIST et al., 1990).

Estas translocações diferem também em nível molecular. Tanto na LLA quanto na LMC com t(9;22), o gene *ABL* é translocado do cromossomo 9 para o 22.

Entretanto, os pontos de quebra no gene *BCR* podem variar. Na LMC, o gene *ABL* se junta à região de 5,8-kb no cromossomo 22, denominada de região de agrupamentos de pontos de quebra (*break cluster region = bcr*), que se encontra em um gene maior, *BCR* (HERMANS et al., 1987; CLARK et al., 1987) (Figura 1).

FIGURA 1. DIAGRAMA E PONTOS DE QUEBRA DA T(9;22) (Q34;Q11)
t(9;22)



Fonte: <<<http://www.AtlasGeneticsOncology.org>>>

Isto resulta em RNA-mensageiro de 8,5-kb, o qual codifica uma proteína de 210 kD, p210 (GROFFEN et al.¹⁶ apud PUI, CRIST e LOOK, 1990, p.1452; KONOPKA et al., 1985; NALDINI et al.¹⁷, apud PUI, CRIST e LOOK, 1990, p.1452). Já nos casos de LLA, o proto-oncogene *ABL* une-se à região 5' do *bcr*, dentro do gene *BCR*, resultando em RNA-mensageiro menor e originando uma proteína de 190 kD, p190 (HEISTERKAMP et al., 1989; CLARK et al., 1989). O gene híbrido é

¹⁶ GROFFEN, J. et al. Philadelphia chromosome breakpoints are clustered within a limited region, *bcr*, on chromosome 22. **Cell**, v. 36, p. 93, 1984.

¹⁷ NALDINI, L. Phosphotyrosine antibodies identify the P210'-" tyrosine kinase and proteins phosphorylated on tyrosine in human chronic myelogenous leukemia cells. **Mol Cell Biol**, v.6, p. 1803, 1986.

chamado *BCR-ABL* e as duas proteínas anômalas codificadas têm atividade aberrante da tirosina quinase, a qual age em uma via de sinalização intracelular. Estas proteínas apresentam papel importante no controle da proliferação celular (LUGO et al., 1990).

A t(9;22) pode ser detectada pela CC, por FISH, pelo método de Southern blot (para recombinação do gene *BCR*) e por RT-PCR (para detecção do RNA-m do *BCR-ABL*).

2.5.3.2.2 t(1;19)(q23;p13)

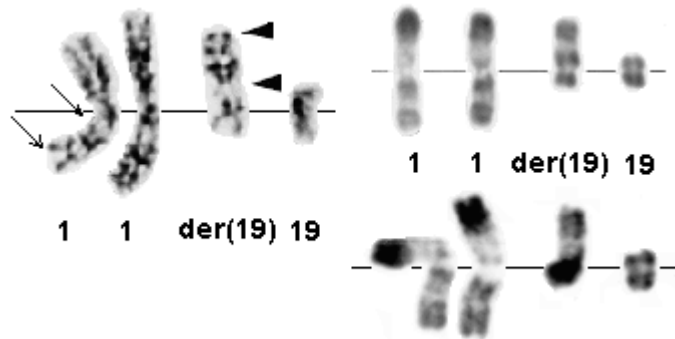
Esta translocação foi descrita pela primeira vez em 1983, por Carroll et al., encontrada em crianças com LLA pré-B com expressão citoplasmática de imunoglobulina (cIg) (CARROLL et al.¹⁸, apud PUI, CRIST e LOOK, 1990, p.1452). Estudos subseqüentes identificaram a t(1;19) em aproximadamente 25% dos casos de LLA pré-B (WILLIAMS et al., 1984; PUI et al., 1986; SECKER-WALKER, 1997). Considerando todos os tipos de LLA pediátrica, esta alteração é encontrada em 5% a 6% dos casos, sendo a translocação mais comum na LLA identificada pela CC (WILLIAMS et al., 1984; CARROLL et al., 1984; SHIKANO et al., 1986; LAI et al., 1989; PUI et al., 1994).

A presença da t(1;19) está associada a alguns fatores de pior prognóstico como contagem elevada de leucócitos, níveis altos de desidrogenase láctica, indivíduos de etnia negra e índice de DNA menor que 1.16 (RAIMONDI et al., 1990; CRIST et al., 1990). Existem formas balanceadas desta translocação, t(1;19)(q23;p13), correspondendo a 25% dos casos, e formas não-balanceadas, der(19)t(1;19)(q23;p13), perfazendo 75% dos casos (Figura 2).

¹⁸ CARROLL, A.J, et al. Pre-B acute lymphocytic leukemia and chromosome translocation 1;19. **Am J Hum Genet**, v.35, p. 60, 1983.

FIGURA 2. AVALIAÇÃO DA DER(19)T(1;19)(Q23;P13) POR CITOGENÉTICA CONVENCIONAL

DER(19)T(1;19)(Q23;P13)



Fonte : <<<http://www.AtlasGeneticsOncology.org>>>

Nestas, o cromossomo 1 derivado é perdido durante a evolução clonal e substituído por uma segunda cópia do cromossomo 1 normal (PRIVITERA et al., 1992; PUI et al., 1994). A t(1;19) está associada a sobrevida menor, sendo que as formas não-balanceadas têm prognóstico melhor que as formas balanceadas (KAMPS et al., 1990; SECKER-WALKER et al., 1992; PRIVITERA et al., 1992). O *Pediatric Oncology Group* (POG) encontrou relação entre pacientes com LLA pré-B e t(1;19) e o risco maior de recidiva do que outras crianças com LLA pré-B (MELLENTIN et al., 1989). Alguns casos em que foram utilizados protocolos terapêuticos mais agressivos mostraram resultados de sobrevida comparáveis aos de pacientes sem esta translocação (sobrevida livre de eventos, em quatro anos, de $73\% \pm 4\%$) (RAIMONDI et al., 1990; RIVERA et al., 1991; RUBIN et al., 1991; UCKUN et al., 1998).

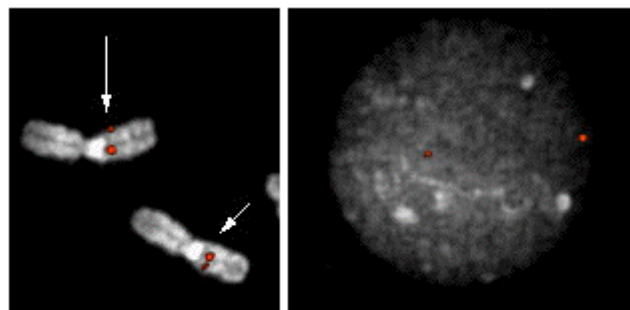
A t(1;19) produz a fusão dos genes *E2A* e *PBX1*. O gene *E2A* está localizado no braço curto do cromossomo 19 (19p13) e codifica os fatores de transcrição E12 e E47, e o gene *PBX1*, localiza-se no braço longo do cromossomo 1 (1q23). Desta fusão resulta o gene híbrido *E2A-PBX1*, que funciona como potente oncogene, contribuindo para a transformação maligna das células pré-B e suas

células progenitoras (MELLENTIN et al., 1989; KAMPS et al., 1990; NOURSE et al., 1990). A detecção das alterações moleculares desta translocação pode ser feita por PCR, identificando os pontos de quebra desta translocação, mesmo em casos com clg negativa com análise por CC normal (PRIVITERA et al., 1992; RAIMONDI et al., 1993) (Figura 3).

FIGURA 3. *C-PBX-1* EM CÉLULAS NORMAIS

PBX1

1Q23



Fonte : <<<http://www.AtlasGeneticsOncology.org>>>

Estudo publicado em 1993, por Borowitz et al., reuniu 738 pacientes com LLA pré-B, com diagnóstico realizado em diferentes instituições, por análise imunofenotípica e por PCR. Os estudos de imunofenotipagem foram satisfatórios em 697 pacientes (94%), destes, 390 (56%) apresentaram alterações citogenéticas, sendo detectada t(1;19) em 5,6% (22 pacientes). Dos 22 pacientes, 20 (91%) apresentaram características iguais na imunofenotipagem, com expressão de CD19, CD10 e CD9, ausência completa de CD34 e ausência parcial de CD20. Todos os casos com estas características de imunofenotipagem e t(1;19), que foram avaliados por PCR, apresentaram fusão *E2A-PBX1*. Os resultados deste trabalho indicam a existência de duas classes de LLA com t(1;19). A grande maioria (90% a 95%) apresenta a fusão *E2A-PBX1* e pode ser reconhecida por características específicas na imunofenotipagem (positividade para CD19, CD10 e CD9, ausência completa de

CD34, positividade ou negatividade para CD20) e a minoria dos casos não tem este fenótipo e não apresenta envolvimento dos genes *E2A* e *PBX1*. A sensibilidade para a presença da t(1;19) pelo fenótipo é de 100%, podendo reduzir a pesquisa da alteração molecular por PCR apenas para os casos com estas características. Esta análise molecular, seletiva para um número menor de pacientes, seria capaz de identificar a fusão *E2A-PBX1* e, assim, beneficiar estes pacientes com um tratamento mais intensivo.

Uma translocação variante da t(1;19) é a t(17;19)(q21-22;p13), que induz a fusão do gene *E2A* com o *HLF* (fator hepático da leucemia). O gene *HLF* encontra-se no cromossomo 17 e codifica proteína análoga às previamente identificadas como fatores de transcrição, contendo zíper de leucina, os quais regulam a expressão dos genes. O gene híbrido formado é *E2A-HLF*, que atua na supressão da morte celular programada (INABA et al, 1992; LOOK, 1998). A t(17;19) é encontrada em aproximadamente 1% das leucemias de linhagem B e, em alguns casos, pode estar associada a coagulação intravascular disseminada (RAIMONDI et al., 1991).

2.5.3.2.3 t(12;21)(p13;q22)

Esta translocação foi descrita pela primeira vez por Romana et al, 1994. Raramente é identificada pela CC (menos de 0,05% dos casos), entretanto, estudos usando as técnicas de FISH e PCR evidenciaram que a t(12;21) é a mais comum na LLA pediátrica, ocorrendo em aproximadamente 25% das LLA de linhagem B (ROMANA et al., 1995; SHURTLEFF et al., 1995; GOLUB et al., 1995; LIANG et al., 1996; HARBOTT et al., 1997, ZEN et al., 2004). A maioria dos pacientes com esta translocação apresenta entre três e seis anos de idade, LLA pré-B e CD10 positivo (RUBNITZ et al., 1997).

O mecanismo molecular da leucemogênese consiste na fusão de dois

genes de fator de transcrição, o *TEL*, da família *ETS* (também conhecido como *ETV-6*), localizado no cromossomo 12, posição 12p13, e o *AML1* (também conhecido como *CBFA*), localizado na posição 21q22, para formar o gene de fusão *TEL-AML1* (ou *ETV-6-CBFA*), no cromossomo derivado 21. O gene *TEL* tem função importante no estabelecimento da hematopoese de todas as linhagens na medula óssea (ROMANA et al., 1995; WIEMELS et al., 1999; VEIGA et al., 2004).

A t(12;21) está associada a bom prognóstico (ROMANA et al., 1995; RUBNITZ et al., 1997; LOH et al., 2006), apesar de um número cada vez maior de pacientes com esta translocação apresentarem recidiva da doença (HARBOTT et al., 1997; SEEGER et al., 1998). Muitos estudos tiveram resultados divergentes em relação ao prognóstico associado à fusão *TEL-AML1*. McLean et al. (1996) publicaram estudo com 22 pacientes com t(12;21) que após acompanhamento de oito anos não recidivaram. Shurtleff et al. (1995) realizaram trabalho descrevendo prognóstico excelente para pacientes com esta translocação. Entretanto, estudos subsequentes mostraram que 25% das crianças com LLA que recidivaram, utilizando os protocolos Berlim-Frankfurt-Münster (BFM), eram *TEL-AML1* positivas (HARBOTT et al., 1997; SEEGER et al., 1998). Outro grupo cooperativo (*UK Medical Research Council*) publicou um artigo em 2001, no qual não conseguiu confirmar melhor prognóstico para crianças com t(12;21) (HANN et al., 2001). Estas diferenças podem ser explicadas pela classificação em grupos de risco e subsequentes tratamentos diferentes, com prognóstico distinto. Em junho de 2006, foi publicado estudo realizado por Loh et al., o qual confirmou melhor prognóstico para pacientes com t(12;21). O estudo foi prospectivo, incluindo 396 crianças com diagnóstico de LLA de diferentes instituições, que foram classificadas em grupos de risco seguindo os mesmos critérios e receberam o mesmo tratamento, conforme o risco. Das 299 crianças com LLA-B, 77 (26%) eram *TEL-AML1* positivas, sendo que nenhum dos 42 pacientes com LLA-T apresentavam esta translocação. O acompanhamento foi realizado por cinco anos e a sobrevida livre de eventos foi de 89% para os pacientes

com t(12;21) e de 80% para os que não apresentavam a translocação; a sobrevida global foi de 97% para os *TEL-AML1* positivos e de 89% para os negativos. Sete crianças com t(12;21) recidivaram, em média 42,8 meses após o diagnóstico, enquanto que no grupo sem a translocação, 37 crianças apresentaram recidiva da doença, em média 28,8 meses após o diagnóstico. Este trabalho confirma o melhor prognóstico das crianças com a t(12;21) (Tabela 4).

TABELA 4. SOBREVIDA LIVRE DE EVENTOS (SLE), SOBREVIDA GLOBAL (SG) E TEMPO MÉDIO DE RECIDIVA EM MESES PARA PACIENTES COM *TEL-AML1* E SEM *TEL-AML1*.

	SLE 5 ANOS (%)	SG 5 ANOS (%)	TEMPO MÉDIO DE RECIDIVA (MESES)
<i>TEL-AML1</i> positivo	89	97	42,8 – 7 pacientes
77 pacientes			
<i>TEL-AML1</i> negativo	80	89	28,8 - 37 pacientes
319 pacientes			

n total = 396 pacientes

Existem três estudos publicados sobre a incidência desta translocação em crianças brasileiras. Magalhães et al., em 2000, analisaram 67 crianças com LLA, sendo 60 com LLA de linhagem B e sete com LLA-T, do Rio de Janeiro e Brasília, utilizando o método de PCR. Encontraram a t(12;21) em 12 pacientes dos 60 com LLA-B (20%), nenhuma criança com LLA-T apresentava a translocação. Em 2004, Zen et al. avaliaram 58 pacientes com LLA de linhagem B, do Rio Grande do Sul, entre seis meses e 16 anos de idade, utilizando a técnica FISH, e em 11 casos (19%) foi encontrada a fusão do gene *TEL-AML1*. Veiga et al. publicaram, também em 2004, estudo com 30 pacientes com diagnóstico de LLA de linhagem B, também do Rio Grande do Sul, porém foram incluídos apenas pacientes com CC sem alterações cromossômicas, morfologia L1 e L2, entre 0 e 12 anos de idade. Foi usado o método FISH para identificação da t(12;21), que foi encontrada em 12

crianças (40%), frequência semelhante à encontrada em estudos realizados em Israel, que utilizaram os mesmos critérios de inclusão (YEHUDA-GAFNI et al., 2002).

2.5.3.2.4 t(8;14); t(8;22) e t(2;8)

A t(8;14)(q24;q32) e suas variantes, t(8;22)(q24;q11) e t(2;8)(q12;q24), foram as primeiras translocações descritas associadas a um imunofenótipo específico, nas neoplasias com células B maduras com imunoglobulina de superfície positiva (slg+), principalmente no linfoma de Burkitt (BERGER et al.¹⁹, apud RAIMONDI, 1993, p.2239). São encontradas em 1% a 2% dos casos de LLA, correspondendo à morfologia L3 (BAIN, 2003). Normalmente, estão associadas a grande quantidade de blastos circulantes, envolvimento inicial de SNC e tumores abdominais (PATTE et al., 1986; MURPHY et al., 1986; FEICKERT et al.²⁰, apud PUI, CRIST e LOOK, 1990, p.1453; SULLIVAN et al., 1990). Pacientes com estas translocações apresentavam inicialmente prognóstico ruim, porém com o uso de tratamentos diferentes a sobrevida melhorou para 60% a 70% (BOWMAN et al., 1996). Pacientes com LLA-L3 respondem melhor a períodos curtos de quimioterapia intensiva do que aos protocolos utilizados para outros tipos de LLA (HOELZER et al., 1996).

O mecanismo de leucemogênese consiste na desregulação do gene *MYC*, um gene de fator de transcrição localizado no braço longo do cromossomo 8, posição 8q24, conseqüente à proximidade com elementos reguladores positivos do gene da imunoglobulina de cadeia pesada (*IgH*), do gene kappa ou do gene lambda.

¹⁹ BERGER, R. et al. t(8; 14) translocation in Burkitt's type of lymphoblastic Leukaemia (L3). **Br J Haematol**, v. 43, p. 87, 1979.

²⁰ FEICKERT, H.J. et al. Childhood acute lymphoblastic leukemia of B-cell type: Trials ALL-BFM 81 and ALL-BFM 83. **Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol**, v. 6, p.149,1987.

A desregulação do *MYC* está associada a um índice de proliferação celular muito elevado. Se analisadas por CC, as translocações da LLA não diferem das encontradas no linfoma de Burkitt, mas ao nível molecular, os pontos de quebra são distintos. Na t(8;14), o *MYC* é translocado para o cromossomo 14, enquanto que na t(2;8) e na t(8;22) o *MYC* permanece no cromossomo 8, mas partes dos genes kappa e lambda, respectivamente, são translocadas para ele (CROCE et al., 1985; BAIN, 2003). A maioria dos casos com t(8;14) apresentam outras anormalidades cromossômicas associadas, freqüentemente envolvendo o cromossomo 1, principalmente duplicação parcial do braço longo. Alguns casos de LLA-L3 não apresentam t(8;14), somente anormalidades nos braços longos dos cromossomos 1 e 6 (SOLOMONS et al., 1983; LAI et al., 1989).

As t(8;14), t(8;22) e t(2;8) podem ser identificadas pelos métodos de CC e FISH (HARRISON, 2001; BAIN, 2003).

2.5.3.2.5 Anormalidades em 11q23 - t(4;11)(q21;q23)

A região q23 do cromossomo 11 é um local freqüente de rearranjos estruturais nas crianças com LLA, sendo estas anormalidades detectadas em 4,5% a 5,7% dos blastos leucêmicos (RAIMONDI et al., 1989; RIVERA et al., 1991). Algumas características estão associadas às anormalidades em 11q23, como contagem elevada de leucócitos, esplenomegalia, hepatomegalia, envolvimento inicial de SNC, anemia, ausência de hiperdiploidia, idade menor no diagnóstico, imunofenótipo pré-B precoce, co-expressão de antígenos mielóides e prognóstico ruim (ARTHUR et al., 1982; NAGASAKA et al., 1983; KOCOVA et al., 1985; MIRRO et al., 1986; STARK et al., 1986; HAGEMEIJER et al., 1987; LAMPERT et al.²¹, apud RAIMONDI, 1993, p.2241; PUI, 1992; SECKER-WALKER et al., 1998; ROWLEY et

²¹ LAMPERT, F. et al. Acute leukemia with chromosome translocation (4;11): 7 new patients and analysis of 71 cases. **Blut**, v. 54, p. 325, 1987.

al., 1998; NYLA et al., 1994). Apesar da maioria dos casos com rearranjos na região 11q23 serem classificados como LLA pré-B precoce (CD19 positivo, HLA-DR positivo e CD10 negativo), existem vários com características mielomonocíticas, de linhagem mista, fenótipo indiferenciado e poucos casos de LLA-T (PARKIN et al.; 1982; NAGASAKA et al., 1983; CHILDS et al., 1988; LO COCO et al., 1989).

A t(4;11)(q21;q23) é a mais comum envolvendo a região 11q23, sendo que sua frequência varia de 1,6 % a 11 % nas crianças e, na maioria dos casos, ocorre em pacientes menores que um ano de idade (PRIGOGINA et al.²², apud PUI et al., 1991, p.440; PARKIN et al., 1982; LEVIN et al.²³, apud PUI et al., 1991, p.440; MIRRO et al., 1986; PUI et al., 1991). No estudo publicado em 1991, por PUI et al., foram avaliadas 1986 crianças com LLA e a t(4;11)(q21;q23) foi encontrada em 40 delas (2%). Esta translocação era mais freqüente no sexo feminino (63%), idade menor que um ano (60%), hiperleucocitose (média de número de leucócitos de $156,5 \times 10^9 / l$), LLA pré-B, CD10 negativo e CD19 positivo, com co-expressão de antígeno mielóide, CD15 (63%). Heerema et al. (1994) analisaram 39 crianças com menos de 12 meses de idade no momento do diagnóstico. Em 12 delas (31%) foi detectada a t(4;11)(q21;q23), e a média de sobrevida livre de eventos nesses pacientes foi de apenas 7 meses, sendo de 23 meses para as crianças sem esta translocação.

A caracterização do ponto de quebra na região 11q23 levou a identificação do gene *MLL* (*myeloid/lymphoid leukemia* ou *mixed lineage leukemia*), também chamado de *ALL1*, *HRX* e *HTRX* (ZIEMAN-VAN et al., 1991; CIMINO et al., 1991). Este gene desempenha papel importante na leucemogênese em crianças. Na

²² PRIGOGINA, E. L. et al. Chromosomes in acute leukemia. **Hum Genet**, v. 53, p. 5, 1979.

²³ LEVIN, M.D. et al. Clinicopathological characteristics of acute lymphoblastic leukemia with the 4;11 translocation. **Pathology**, CIDADE, v. 16, p.63, 1984.

t(4;11)(q21;q23) ocorre a fusão de parte do gene *MLL* com parte do gene *AF4* em 4q21, resultando no gene de fusão *MLL-AF4* (DJABALI et al., 1992; BAIN, 2003).

Outras translocações com pontos de quebra envolvendo a região q23 do cromossomo 11 incluem t(1;11)(p32;q23), t(6;11)(q27;q23), t(9;11)(p22;q23) t(10;11)(p12;q23) e t(11;19)(q23;q13), que estão associadas a linhagem linfóide, mielóide e mista (PUI et al., 1987; RAIMONDI et al., 1989). Estes achados sugerem que as leucemias com rearranjo em 11q23 originam-se de uma célula progenitora multipotencial capaz de se diferenciar tanto em linhagem linfóide como mielóide (ABE et al., 1984; PUI et al., 1987).

Algumas destas translocações são difíceis de serem identificadas pela CC, assim como duplicações e deleções no gene *MLL*. Para identificação adequada destas anormalidades é importante a complementação da análise com outras técnicas como FISH e Southern blotting (SCHICHMAN et al., 1994; CUTHBERT et al., 2000; HARRISON, 2001). Pais et al. (2005) publicaram estudo com 213 casos de LLA, em pacientes de 0 a 25 anos, e seis casos de LMA e analisaram a presença de anormalidades envolvendo o gene *MLL* usando as técnicas de CC, FISH e Southern blotting. Dos 218 casos analisados por Southern blotting, foram detectados rearranjos no gene *MLL* em 23 pacientes. Destes casos, somente em 14 as alterações foram identificadas pela CC. Considerando apenas os casos em crianças abaixo de um ano, a frequência de rearranjos no gene *MLL* foi de 75% (9 pacientes em 12). Na faixa etária que compreende pacientes entre um ano até 25 anos de idade a frequência das anormalidades no gene *MLL* foi de 6,8%.

2.5.3.2.6 Anormalidades em 6q

A deleção do braço longo do cromossomo 6 é um achado relativamente comum na LLA, ocorrendo em 4% a 13% dos casos, a maioria deles com pontos de quebra localizados nas regiões 6q15 e 6q21 (PRIGOGINA et al., 1988; RABBITTS,

1991; RAIMONDI, 1993). As alterações mais comuns são as deleções (del 6q) (HAYASHI et al., 1990; MERUP et al., 1998). Normalmente elas aparecem como uma alteração secundária, o que sugere que podem ter influência na progressão da doença, apesar de aparentemente não interferir no prognóstico (HEEREMA et al., 2000). As características clínicas e a sobrevida livre de eventos das crianças com anormalidades em 6q não são diferentes daquelas de pacientes sem a alteração. Não há indicação de imunofenótipos específicos, sugerindo que os genes envolvidos nestas anormalidades são ativos em várias etapas do processo de leucemogênese (RAIMONDI, 1993).

É difícil de identificar os pontos de quebra em 6q através da CC, pois há uma variedade grande de regiões de deleção descrita. O método FISH tem sido efetivo para caracterizar os pontos de quebra, detectando até mesmo deleções mínimas em 6q (SHERRATT et al., 1997; JACKSON et al., 2000).

2.5.3.2.7 Anormalidades em 9p

Anormalidades no braço curto do cromossomo 9 são encontradas em 7% a 12% dos casos de LLA pediátrica (KOWALCZYC et al., 1983; CHILCOTE et al.²⁴, apud RAIMONDI, 1993, p.2243; POLLAK et al., 1987; MURPHY et al., 1989). Estudos publicados por Kowalczyc et al. (1983) e por Chilcote et al. (1985), associaram as anormalidades em 9p com LLA-T, linfonodomegalia, alargamento de mediastino e esplenomegalia. No entanto, Carroll et al. (1987), avaliaram 100 crianças com LLA e encontraram anormalidades em 9p em sete delas, sendo somente uma LLA-T e as demais LLA pré-B. Pollak e Hagemeijer (1987) também encontraram anormalidades em 9p em pacientes com LLA de linhagem B. Rivera et

²⁴ CHILCOTE, R. R. Lymphoblastic leukemia with lymphomatous features associated with abnormalities of the short arm of chromosome 9. **N Engl J Med**, v. 313, p. 286, 1985.

al. (1991) realizaram um estudo avaliando esquemas quimioterápicos mais intensivos para tratamento da LLA e evidenciaram que os pacientes com anormalidades em 9p, translocações ou deleções, apresentaram pior prognóstico, com sobrevida livre de eventos, em quatro anos, de 50% , enquanto os demais apresentaram 73%.

A região chave envolvida nas alterações em 9p é p21-p22, que contém o grupamento do gene interferon alfa (*IFNA*) e do gene interferon beta (*IFNB1*). Estes genes estão incluídos em segmentos sabidamente deletados em alguns casos de LLA, que podem apresentar ou não anormalidades citogenéticas em 9p (DIAZ et al., 1990; MIDDLETON et al., 1991). Possivelmente estas deleções levam à perda de um gene supressor de tumor localizado na região de 9p. A deficiência da enzima metiltioadenosina fosforilase (*MTAP*), mapeada em 9p, foi relatada em muitos casos de deleção do gene *IFN*, sugerindo uma ligação entre esses genes (TRAWECK et al., 1988).

2.5.3.2.8 Anormalidades em 12p

As anormalidades no braço curto do cromossomo 12 são identificadas através da CC em 8% a 11% das LLAs (RAIMONDI et al., 1986; VAN DER PLAS et al., 1994). O ponto de quebra mais comum é o p12, porém também são relatados outros pontos de quebra como p11 e p13, onde se localiza o gene *TEL*. Mais de 30 translocações diferentes já foram descritas envolvendo o gene *TEL*, entretanto, nem todos os rearranjos em 12p ocorrem no loco deste gene (RAIMONDI et al., 1997; ODERO et al., 2001). O mecanismo pelo qual os rearranjos que não envolvem o gene *TEL* contribuem para o desenvolvimento da LLA é desconhecido. Existe a possibilidade que múltiplos genes localizem-se em 12p13 e, quando ocorre a translocação cromossômica, tornem-se capazes de induzir a transformação maligna da linhagem linfóide (REID et al., 2006). A maioria dos casos com alterações em 12p

são LLA de linhagem B, mas alguns casos de LLA-T já foram relatados (RAIMONDI, 1993). A maioria dos rearranjos envolvendo 12p são translocações, incluindo $\text{dic}(9;12)(p11;p12)$, $\text{dic}(7;12)(p11;p11)$, $\text{t}(12;13)(p13;q14)$, $\text{t}(2;12)(q14;p13)$ e $\text{t}(12;17)(p13;q21)$ (CARROLL et al., 1987; RAIMONDI et al., 1991; BEHRENDT et al., 1995). Deleções em 12p correspondem a 25% destas alterações (RAIMONDI, 2000).

A $\text{t}(12;17)(p12\sim13;q11\sim21)$ é rara, porém é um rearranjo citogenético recorrente primário da LLA. Até 2006, apenas 18 casos desta alteração tinham sido descritos, 15 presentes em pacientes com LLA, e os demais em casos de LMA ou leucemia bifenotípica (REID et al., 2006). Foi descrita associação com características de leucemia bifenotípica e com pior prognóstico (HEEREMA et al., 2000). O prognóstico dos pacientes com $\text{dic}(9;12)(p11;p12)$ está associado a bom prognóstico (MAHMOUD et al., 1992; RAIMONDI, 2000).

2.5.3.2.9 LLA-T

A LLA-T corresponde a aproximadamente 15% dos casos de LLA pediátrica e apresenta pior prognóstico, que pode ser atribuído a hiperleucocitose, envolvimento freqüente de SNC, alargamento de mediastino, idade maior no momento do diagnóstico e falta de hiperdiploidia com mais de 50 cromossomos (RAIMONDI, 1993; UCKUN et al., 1998). Paradoxalmente, as anormalidades cromossômicas são menos freqüentes na LLA-T do que na LLA de linhagem B e, ao contrário da LLA de linhagem B, na LLA-T alterações específicas não são úteis para classificação de risco dos pacientes (BERGER et al., 1990; RIVERA et al., 1991; PULLEN et al., 1999).

Aproximadamente 30% a 40% dos cariótipos anormais na LLA-T apresentam pontos de quebra não-randômicos nas regiões 14q11, 7q34-q36 e 7p15, os quais contêm os genes *TCRA/D*, *TCRB* e *TCRG*, respectivamente (CROCE et al.,

1985; BERGER et al., 1990). O quarto loco identificado em que ocorre rearranjo estrutural durante a diferenciação das células T são análogos aos genes de imunoglobulinas do desenvolvimento das células B (RAIMONDI, 1993). Nestes rearranjos, nos genes TCR, elementos de realce são colocados próximos de um número de oncogenes, levando a aumento da expressão destes, de uma maneira similar àquela descrita nos rearranjos envolvendo células B (HARRISON, 2001). As alterações mais comuns encontradas na LLA-T são t(11;14)(p13;q11), t(11;14)(p15;q11), t(8;14)(q24;q11), t(10;14)(q24;q11), t(1;14)(p32-p34;q11) e alterações envolvendo 7q34-35 (WILLIAMS et al., 1984; ERIKSON et al., 1986; DUBÉ et al., 1986; RAIMONDI et al., 1988; CARROLL et al., 1990).

2.5.3.2.10 t(11;14)(p13;q11)

É a alteração mais freqüentemente detectada por CC na LLA-T, ocorrendo em 7% dos casos (WILLIAMS et al., 1984; RAIMONDI et al., 1988; RIBEIRO et al., 1991).

O ponto de quebra no cromossomo 14 ocorre no loco A/D do gene *TCR*, e no cromossomo 11 existe um grupamento de pontos de quebra na região p13 (T-LLAbcr) (YOFFE et al., 1989; ROYER-POKORA et al., 1989).

2.5.3.2.11 t(11;14)(p15;q11)

Encontrada em 1% das LLA-T (RAIMONDI et al., 1988; RIBEIRO et al., 1991). Esta translocação envolve o loco A/D do gene *TCR* no cromossomo 14 (BOEHM et al., 1988). No cromossomo 11 a quebra ocorre em um gene chamado *TTG1* (*T cell translocation gene 1*) ou *RBTN1* (*rhombotin 1*), que codifica uma proteína nuclear com importante atuação no desenvolvimento do SNC (MCGUIRE et al., 1989; BOEHM et al., 1991).

2.5.3.2.12 t(10;14)(q24;q11)

Descrita em 5% a 10% dos casos de LLA-T e linfomas (DUBE et al., 1986). Ocorre no loco D no cromossomo 14 e na região q24 do cromossomo 10, sugerindo que a translocação resulta da desregulação de um gene chamado *HOX11* (HATANO et al., 1991). Esta translocação somente pode ser identificada através de PCR (KAGAN et al., 1990).

2.5.3.2.13 t(8;14)(q24;q11)

É observada em 2% das LLA-T, porém não é exclusiva desta linhagem (RAIMONDI et al., 1988; LANGE et al., 1992). O gene *TCRA/D* sofre um rearranjo em uma posição próxima ao loco do proto-oncogene *MYC*, na região 8q24, levando a uma desregulação na transcrição deste gene (ERIKSON et al., 1986; SHIMA et al., 1986; BERNARD et al.²⁵, apud PUI, CRIST e LOOK, 1990, p.1454).

2.5.3.2.14 t(1;14)(p33; q11)

Ocorre em aproximadamente 3% dos pacientes com LLA-T (CARROLL et al., 1990; BEGLEY et al., 1999). No cromossomo 14 o ponto de quebra ocorre no loco do gene *TCRA/D* e no cromossomo 1 o ponto de quebra é na região 1p33, gene *TAL1*. Este é um fator de transcrição que modula a expressão do gene e apresenta papel fundamental na hematopoese (HARRISON, 2001).

2.5.3.2.15 Anormalidades em 7q34-35

²⁵ BERNARD, O. et al. Molecular mechanisms of a t(8;14)(q24;q11) translocation juxtaposing c-myc and TCR- α genes in a T-cell leukaemia: Involvement of a V α internal heptamer. **Oncogene**, v. 2, p. 195, 1988.

A região de 7q que contém o gene *TCRB* é menos envolvida que as regiões do gene *TCRA/D* no cromossomo 14 (KANEKO et al., 1988). O loco do *TCRB* participa de várias trocas recíprocas com diferentes cromossomos (RAIMONDI et al., 1987). As $t(7;9)(q34;q32)$ e $t(7;19)(q35;p13)$ resultam da desregulação da expressão dos genes *TAL2* e *LYL*, respectivamente (MELLENTIN et al., 1989).

Schneider et al. (2000) estudaram 343 casos de LLA-T pediátrica. Em relação a ploidia, 62,2% dos pacientes apresentaram pseudodiploidia e entre as trissomias a mais comum foi a do cromossomo 8, em 10,9%. Em 60 pacientes (30%) foram encontrados rearranjos nas regiões 7p15, 7q32-36 e 14q11-13. As alterações envolvendo o cromossomo 14 corresponderam a 21% dos casos. Foram relatadas neste estudo 5 aberrações recorrentes não descritas antes, quais sejam, $del(1)(p22)$, $dup(2)(q21-32q31-37)$, $t(8;12)(q13;p13)$, $del(13)(q)$ e trissomia do cromossomo 9. A sobrevida livre de eventos, em cinco anos, foi de 51% para os pacientes com anormalidades citogenéticas e de 62% para os que apresentavam cariótipo normal.

Haltrich et al. (2007) avaliaram a presença de alterações no cromossomo 3 em crianças com LLA-T, que são muito raras. Foram analisadas 32 crianças com LLA, destas 7 com LLA-T. Através da análise por CC não foi detectada nenhuma alteração no cromossomo 3, no entanto, com o uso de FISH foram identificadas aberrações no cromossomo 3 em quatro pacientes com LLA-T. As alterações encontradas foram deleções em 3p12~p13 e trissomias de 3q.

2.6 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Os sinais e sintomas apresentados pela criança com LLA refletem o impacto da infiltração da medula óssea por blastos, assim como a presença destes em outros órgãos. Os sintomas e achados de exame físico mais freqüentes são manifestações da anemia, plaquetopenia e neutropenia, resultantes da falha de

produção da medula óssea substituída por células leucêmicas.

Palidez, falta de apetite e astenia são causadas pela anemia; febre e infecções de repetição pela neutropenia; presença de petéquias e equimoses e sangramentos, como epistaxe e gengivorragia, pela plaquetopenia. A dor óssea, sintoma comum na LLA, representa o comprometimento leucêmico do periósteo e da cortical. São achados comuns hepatomegalia, presente em 2/3 dos pacientes, esplenomegalia e linfonodomegalia, que pode ser localizada ou generalizada (MARGOLIN, STEUBER e POPLACK, 2005). Mesmo quando há envolvimento do SNC, os sintomas raramente estão presentes no momento do diagnóstico. Pode ocorrer cefaléia, tontura, vômitos e crise convulsiva.

Pacientes com LLA de linhagem T, aproximadamente 15 % de todos os casos de LLA, apresentam algumas características peculiares. Ocorre mais comumente em meninos, idade maior que 10 anos ao diagnóstico, contagem inicial de leucócitos elevada e presença de massa mediastinal. Aproximadamente 50% dos pacientes com LLA-T apresentam massa mediastinal e 30% a 50% têm contagens de leucócitos superiores a 100.000/ μ l (CRIST et al., 1988; PUI et al., 1990; SANTANA et al., 1990). Também ocorre envolvimento do SNC no diagnóstico, com maior frequência, em 10% a 15% dos pacientes (PUI et al., 1990; STEINHERZ et al., 1998).

A duração dos sintomas de uma criança com LLA pode variar de dias a meses, mas na maioria dos casos o tempo de início dos sintomas é bastante curto. Normalmente, 4 a 6 semanas antes do diagnóstico, a maioria das crianças era saudável (GREAVES, 1999).

No estudo realizado no Hospital A. C. Camargo, em São Paulo, foram avaliadas 392 crianças com LLA no período de 1980 a 1996. A principal queixa foi febre (17,6%), seguida de dor óssea (17,3%) e palidez (16,6%). Equimoses e sinais clínicos de infecção foram as queixas que mais rapidamente levaram os pacientes a algum serviço médico (menos de 15 dias), enquanto crianças com palidez e dor

óssea demoraram 30 dias ou mais para serem levadas ao médico. A febre foi o sintoma mais comum (55%), seguida de palidez (54,3%), hepatomegalia maior que 5 cm (42%), esplenomegalia maior que 5 cm (38,7%) e dor óssea (30,3%) (LOPES e MENDES, 2000).

Como muitos dos sinais e sintomas da LLA são inespecíficos, como mal-estar, febre, falta de apetite e irritabilidade, várias doenças devem ser incluídas no diagnóstico diferencial. Entre elas estão doenças não malignas como mononucleose infecciosa, coqueluche, infecção por citomegalovírus (SILVERMAN e SALLAN, 2003; MARGOLIN, STEUBER e POPLACK, 2005), anemia aplástica (MATLOUB et al., 1993) e infecções agudas que cursam com linfocitose. A coqueluche deve ser considerada no diagnóstico diferencial quando se acompanha de linfocitose intensa. Doenças malignas que também infiltram medula óssea, como neuroblastoma e linfoma não-Hodgkin, podem apresentar sintomas iguais aos da LLA (SILVERMAN e SALLAN, 2003; MARGOLIN, STEUBER e POPLACK, 2005). Nos casos de dores ósseas em membros inferiores (MMII), com dificuldade de deambulação, o diagnóstico diferencial deve ser realizado com artrite reumatóide juvenil e osteomielite (ROGALSKY et al., 1986; KAI et al., 1996).

2.7. ALTERAÇÕES LABORATORIAIS

Aproximadamente 50% dos pacientes com LLA apresentam contagem inicial de leucócitos elevada, acima de 10.000/ μ l e cerca de 20% acima de 50.000/ μ l. Neutropenia (menos de 500 granulócitos/ μ l) é um achado comum ao diagnóstico e aumenta o risco de infecção. Os blastos podem estar ausentes no sangue periférico. Hemoglobina menor que 10g/dl está presente em 80% dos pacientes ao diagnóstico. Mesmo com concentrações baixas de hemoglobina, a anemia é normocítica e normocrômica e a contagem de reticulócitos é baixa. Plaquetopenia está presente na maioria dos pacientes, sendo a contagem de plaquetas menor que 100.000/ μ l em

aproximadamente 75% dos casos (MARGOLIN, STEUBER e POPLACK, 2005). Algumas crianças com LLA, mesmo com infiltração da medula óssea por blastos, podem apresentar hemograma normal (SILVERMAN e SALLAN, 2003).

Em alguns casos a LLA pode se manifestar com pancitopenia, e o diagnóstico diferencial com anemia aplástica deve ser feito. Uma explicação inclui inibição dos progenitores hematopoéticos normais pelas células leucêmicas, com evidência de reação celular anormal durante ou antes da aplasia, seguida por diagnóstico definitivo de LLA (KIKUCHI et al., 1999).

Outras alterações laboratoriais dependem da quantidade de blastos circulantes, da extensão da doença extramedular, da proliferação excessiva e destruição das células leucêmicas. Elevação da concentração sérica de desidrogenase láctica é comum em pacientes com grande quantidade de blastos circulantes e reflete o aumento do anabolismo e catabolismo das purinas (MARGOLIN, STEUBER e POPLACK, 2005). As concentrações séricas de ácido úrico também podem estar aumentadas, principalmente após o início do tratamento, quando ocorre maior lise celular.

Anormalidades metabólicas podem ser encontradas, como hiperpotassemia, hiperfosfatemia e hiper ou hipocalcemia. A hipercalcemia está presente quando há infiltração óssea pela LLA. A hiperfosfatemia pode ser decorrente da lise celular e induzir hipocalcemia. São mais freqüentes em pacientes com linfonodomegalia, hepatoesplenomegalia e contagem elevada de leucócitos (MARGOLIN, STEUBER e POPLACK, 2005).

2.8 DOENÇA EXTRAMEDULAR

Os locais mais freqüentemente acometidos pela LLA são: SNC, testículos, fígado, baço, linfonodos e rins. Em relação à conduta terapêutica e ao prognóstico, os que apresentam maior importância são SNC e testículos.

O SNC está envolvido em menos de 5% das crianças com LLA ao diagnóstico (BLEYER, 1988). Mesmo crianças com envolvimento do SNC pela LLA são, na maioria das vezes, assintomáticas. Pacientes sintomáticos podem apresentar sinais e sintomas neurológicos, localizados ou difusos, e também manifestações de hipertensão intracraniana (vômitos, cefaléia, letargia, edema de papila), convulsões, rigidez de nuca e irritabilidade. Infiltração do nervo óptico pode causar alterações visuais. A forma mais incomum da leucemia em SNC é síndrome hipotalâmica com obesidade, na qual ocorre destruição do núcleo ventromedial do hipotálamo (centro da saciedade), resultando em hiperfagia, ganho excessivo de peso e/ou diabetes insipidus.

Para o diagnóstico do envolvimento meníngeo do SNC é necessário o exame citológico para confirmação da presença de blastos no líquido. O líquido é obtido por punção lombar e deve ser examinado após centrifugação, procedimento que concentra as células leucêmicas e aumenta a sensibilidade para o diagnóstico. A classificação do comprometimento do SNC considera como grau 1 (SNC-1) quando não são visualizados blastos; grau 2 (SNC-2) quando são encontrados menos de 5 leucócitos/ μ l com presença de blastos; e grau 3 (SNC-3) quando há mais de 5 leucócitos/ μ l com blastos ou paralisia de nervos cranianos (SMITH et al., 1996). A terapia de prevenção da doença no SNC resultou em melhores resultados terapêuticos, diminuindo as taxas de recidiva neurológicas, que eram comuns e respondiam mal ao tratamento (CORTES et al., 1995; NACHMAN et al., 1998, PUI et al., 1998).

A apresentação clínica da LLA testicular é o aumento doloroso de um ou ambos os testículos, raramente visto ao diagnóstico. Em 25% dos pacientes há doença microscópica no momento do diagnóstico, detectada apenas por biópsia testicular. Como este achado parece não ter importância no prognóstico não existe indicação de realizar biópsia testicular de rotina ao diagnóstico. Esta deve ser feita bilateralmente quando há suspeita de envolvimento de um testículo, pois é comum o

comprometimento do testículo contralateral.

Os testículos são considerados um santuário leucêmico, favorecendo recidiva da doença extramedular, que ocorre em aproximadamente 5% dos casos. Alguns fatores relacionados a maior risco de recidiva nos testículos são: contagem inicial de leucócitos elevada (mais de 20.000/ μ l), LLA-T, linfonodomegalia e esplenomegalia proeminentes e plaquetopenia significativa (menos de 30.000/ μ l) (KAY, 1983).

2.9 FATORES PROGNÓSTICOS

Algumas características clínicas e laboratoriais encontradas ao diagnóstico, assim como a boa resposta ao tratamento de indução, apresentam valor prognóstico. A identificação destes fatores tornou-se essencial para a análise e escolha do tratamento, classificando cada paciente em grupos de risco e indicando o tratamento conforme esta classificação. Alguns fatores já identificados como de valor prognóstico na LLA são: idade, contagem inicial de leucócitos, características imunofenotípicas, anormalidades cromossômicas, envolvimento de SNC ao diagnóstico e resposta ao tratamento de indução (SMITH et al., 1996).

Como idade e contagem inicial de leucócitos são parâmetros mais fáceis e rápidos de avaliar no momento do diagnóstico, eles são muito usados para a classificação dos grupos de risco. Em 1996, foi estabelecido pelos critérios do *National Cancer Institute* (NCI) que pacientes entre um e 9,9 anos de idade e com contagem de leucócitos menor que 50.000/ μ l são considerados como de risco *standard* e pacientes com 10 anos de idade ou mais e contagem de leucócitos maior ou igual a 50.000/ μ l são considerados como de alto risco (SMITH et al., 1996).

2.9.1 Idade

A idade dos pacientes com LLA apresenta associação importante com o

prognóstico. Na LLA pediátrica, o prognóstico de crianças abaixo de um ano de idade e adolescentes é pior do que o das crianças entre um e 10 anos de idade (BIONDI et al., 2000; SILVERMAN et al., 2001). A LLA em lactentes (menores que um ano) está associada a contagem elevada de leucócitos ao diagnóstico, aumento da incidência de envolvimento de SNC, organomegalia maciça, plaquetopenia, dificuldade de conseguir remissão completa da doença no décimo quarto dia do tratamento e, além destas características, apresentam alta incidência de rearranjos no gene *MLL*, sendo a *t(4;11)* a anormalidade mais comum (REAMAN et al., 1985; KATZ et al., 1988; LUDWIG et al., 1989; BEHM et al., 1996). A sobrevida livre de eventos neste grupo varia de 10% a 20% (REAMAN et al., 1985; CHESSELLS et al., 1994; PUI et al., 1995). O prognóstico para os adolescentes (idade entre 10 e 21 anos) também é pior, se comparado ao das outras crianças com LLA, apesar de não ser pior que o da LLA dos lactentes. Normalmente, a LLA nos adolescentes é de linhagem T e está associada ao sexo masculino, contagem elevada de leucócitos ao diagnóstico e menor incidência da fusão gênica *TEL-AML1*, considerada como fator de prognóstico favorável (CRIST et al., 1988; MCLEAN et al., 1996).

2.9.2 Contagem inicial de leucócitos

A contagem inicial de leucócitos é considerada um fator prognóstico importante, sendo que contagens acima de 50.000/ μ l (que ocorrem em cerca de 20% das LLAs pediátricas) estão associadas a pior prognóstico (SMITH et al., 1996).

2.9.3 Características da Imunofenotipagem

Historicamente, a LLA de linhagem T foi caracterizada por apresentar período curto de remissão e sobrevida baixa, porém estudos posteriores evidenciaram que pacientes com LLA-T tratados com esquemas quimioterápicos intensivos e de menor duração (aproximadamente um ano) apresentam a mesma

resposta ao tratamento que os pacientes com LLA de linhagem B (PUI, CRIST e LOOK, 1990; STEINHERZ et al., 1998; VAN DEN et al., 1998; SILVERMAN et al., 2001).

A co-expressão de marcadores mielóides (CD13, CD33, CD15) apresenta significado clínico controverso. Vários estudos relataram pior prognóstico dos pacientes com co-expressão de antígenos mielóides (KUREC et al., 1991; CANTU et al., 1991; WIERSMA et al., 1991; FINK et al., 1993), enquanto outros não encontraram diferenças na sobrevida dos pacientes com ou sem co-expressão destes antígenos (BRADSTOCK et al., 1989; PUI et al., 1991; LUDWIG et al., 1990 e 1993; VALLE et al., 2002; SILVA et al., 2004). Pacientes com co-expressão de antígenos mielóides, tratados com esquema quimioterápico mais intensivo, apresentaram mesma sobrevida dos pacientes sem esta co-expressão (PUI et al., 1990; BOROWITZ et al., 1991).

2.9.4 Anormalidades Cromossômicas

Alterações cromossômicas, tanto numéricas quanto estruturais, são fatores importantes no prognóstico. Hiperdiploidia, com mais de 50 cromossomos, e trissomias dos cromossomos 4 e 10 estão associados a melhor prognóstico. Alguns estudos relacionaram a fusão dos genes *TEL-AML1*, resultante da t(12;21) com melhor prognóstico (SHURTLEFF et al., 1995; LOH et al., 2006), porém esta relação não foi confirmada por outros investigadores (HARBOTT et al., 1997; SEEGER et al., 1998; HANN et al., 2001).

Hipodiploidia (menos de 45 cromossomos), rearranjos no gene *MLL* no cromossomo 11q23 e presença de cromossomo Filadélfia são fatores que conferem pior prognóstico (PUI et al., 1987; HEEREMA et al., 1999; RAIMONDI et al., 2003, CHARRIN et al., 2004; BEHM et al., 1996; BLOOMFIELD et al., 1989; CRIST et al., 1990; FLETCHER et al., 1992; UCKUN et al., 1998).

Com o uso de terapias mais intensivas, a t(1;19) deixou de ser considerada de pior prognóstico (PUI et al., 1984; RAIMONDI et al., 1990; RIVERA et al., 1991; UCKUN et al., 1998).

2.9.5 Envolvimento de SNC ao Diagnóstico

A maioria dos investigadores considera o envolvimento do SNC ao diagnóstico fator de pior prognóstico e, frequentemente, os pacientes SNC-3 são tratados com terapia mais agressiva (SILVERMAN e SALLAN, 2003). Mesmo pacientes classificados como SNC-2 apresentam pior resposta ao tratamento (GAJJAR et al., 2000) e alguns estudos sugerem que estes pacientes também devam ser tratados de maneira mais intensiva, com quimioterapia intratecal adicional (BURGER et al., 2003).

2.9.6 Resposta ao Tratamento de Indução

A resposta ao tratamento é determinada por vários fatores, incluindo as características genéticas dos blastos e variáveis farmacogenéticas de cada paciente, sendo um dos fatores prognósticos mais importantes na LLA (PUI et al., 2001). Pacientes que não apresentam remissão completa da doença (presença de menos de 5% de blastos) após o período de indução do tratamento, que dura de quatro a seis semanas, têm maior risco de recidiva e sobrevida menor (MILLER et al., 1980). A persistência de blastos no sangue periférico no sétimo dia de tratamento e, na medula óssea, no décimo-quarto dia são preditivos de falha para conseguir remissão completa da doença e fator de risco para recidiva (ARICO et al., 1995; DONADIEU et al., 2001).

2.9.7 Doença Residual Mínima

A detecção da doença residual mínima (DRM) na medula óssea é realizada através da imunofenotipagem ou análise dos rearranjos clonais do gene antígeno-receptor por PCR e é muito mais sensível e específica que o exame morfológico dos blastos (PUI et al., 2001). A remissão imunológica ou molecular é definida como presença de menos de 0,01% de células nucleadas da medula óssea no término da fase de indução (PUI et al., 2004).

Pacientes em remissão imunológica ou molecular, no término do tratamento de indução, apresentam melhor prognóstico do que aqueles com remissão completa identificada apenas por critérios morfológicos (PUI et al., 1998). Pacientes em remissão morfológica, mas com DRM de 1% ou mais no final da sexta semana de tratamento, apresentam risco elevado de recidiva, que é semelhante ao dos pacientes que necessitam de prolongamento da terapia de indução para conseguir remissão completa da doença (PUI et al., 2004).

Pacientes tratados com os protocolos BFM e do *St. Jude Children's Research Hospital*, com DRM detectada em qualquer momento do tratamento, mas, especialmente, no término da indução e, precocemente, na fase pós-remissão do tratamento (semanas 12 e 14 do tratamento, respectivamente), apresentaram taxas de recidiva mais altas (VAN DONGEN et al., 1998; COUSTAN-SMITH et al., 2000). Estes estudos confirmam, por análise multivariada, que os níveis de DRM podem ser considerados como um fator de risco independente para a recidiva. Níveis altos de DRM presentes no décimo-quinto dia do tratamento de indução também estão relacionados a pior prognóstico (PANZER-GRUMAYER et al., 2000).

2.9.8 Sexo

Alguns investigadores evidenciaram que crianças do sexo masculino apresentam pior prognóstico que do sexo feminino (CHESSELLS et al., 1995; PUI et al., 1999). Apesar destes resultados serem atribuídos à recidiva testicular, maior

incidência de LLA-T e baixa frequência de hiperdiploidia em meninos, supõe-se que existam outros fatores genéticos, metabólicos e endocrinológicos que contribuem com esta diferença (CHESSELS et al., 1995; PUI et al., 1999; MARGOLIN, STEUBER e POPLACK, 2005).

Estudos realizados por SILVERMAN et al. (2001) e por PUI et al. (2003) evidenciaram que o sexo masculino deixou de ser considerado fator de pior prognóstico nestes estudos clínicos, com sobrevida livre de eventos, em cinco anos, de 80%, para os meninos.

2.9.10 Etnia

O efeito da etnia no prognóstico tem sido um assunto controverso. Os pacientes negros apresentam características biológicas e clínicas diferentes, incluindo maior frequência de contagem elevada de leucócitos, presença de massa mediastinal, morfologia L2 e menor incidência de hiperdiploidia, apresentando pior resposta ao tratamento (POLLOCK et al., 2000; PUI et al., 2003).

2.9.11 Fatores farmacodinâmicos e farmacogenéticos

Fatores individuais de cada paciente podem exercer grande influência na resposta ao tratamento. A rapidez e efetividade com que são metabolizados os agentes quimioterápicos são variáveis em cada paciente e afetam o prognóstico (PUI et al., 2002; SILVERMAN e SALLAN, 2003). Polimorfismos, envolvendo várias enzimas que atuam no metabolismo das drogas, estão relacionados ao prognóstico. Algumas alterações em enzimas que metabolizam as drogas quimioterápicas estão associadas a melhor prognóstico, como a deficiência da enzima que inativa a mercaptopurina, tiopurina metiltransferase, que está associada a melhor controle da LLA, porém com risco aumentado de segunda neoplasia associada ao tratamento e possível aumento dos efeitos tóxicos da medicação (PUI et al., 2002; EVANS, 2004).

Outros polimorfismos, como da timidilato sintase, que atua no metabolismo do metotrexato, podem aumentar a expressão das enzimas, com maior metabolização das drogas e pior resposta ao tratamento (KRAJINOVIC et al., 2002).

2.9.11 Estudos para análise de fatores prognósticos

Hann et al. (2001) publicaram um estudo na tentativa de confirmar a importância de vários fatores prognósticos. Avaliaram 2090 crianças com diagnóstico de LLA tratadas com o protocolo *Medical Research Council United Kingdom acute lymphoblastic leukaemia XI (MRC UKALL XI)*. A análise multivariada confirmou a influência da idade, sexo e contagem inicial de leucócitos no prognóstico, assim como algumas alterações cromossômicas, presença de blastos na medula óssea no oitavo dia de tratamento e aquisição de remissão completa no término do tratamento de indução. Pacientes com menos de 10 anos de idade e contagem de leucócitos menor que 50.000/ μ l apresentaram sobrevida livre de eventos, em cinco anos, de 69% enquanto que em maiores de 10 anos, com contagem de leucócitos maior que 50.000/ μ l, a sobrevida foi de 39%. As meninas apresentaram melhor prognóstico que os meninos. Hiperdiploidia, com mais de 50 cromossomos também foi fator de bom prognóstico. Hipodiploidia, entre 23 e 29 cromossomos, presença de t(4;11), t(9;22) e anormalidades em 9p foram fatores de pior prognóstico. Pacientes com t(1;19) não apresentaram resposta pior ao tratamento. Organomegalia, níveis de hemoglobina, classificação morfológica FAB, envolvimento do SNC ao diagnóstico, características imunofenotípicas e presença da fusão gênica *TEL-AML1* não tiveram nenhuma influência no prognóstico. Os pacientes com DRM não detectável no oitavo dia do tratamento apresentaram bom prognóstico, enquanto a pequena proporção de pacientes que não conseguiram remissão completa no término da indução apresentaram sobrevida livre de eventos em cinco anos de apenas 30%.

Um trabalho mais recente, publicado em fevereiro de 2007, realizado por Schultz et al., analisou os fatores prognósticos do *Pediatric Oncology Group* (POG) e do *Children's Cancer Group* (CCG). Foram avaliadas, retrospectivamente, 6238 crianças com diagnóstico de LLA de linhagem B, representando a maior análise de fatores prognósticos realizada até o momento na tentativa de validar marcadores prognósticos identificados em amostras menores. Neste estudo, idade e contagem inicial de leucócitos mostraram ter importância no prognóstico, porém sexo, raça, presença de hepatoesplenomegalia e massa mediastinal, assim como a classificação FAB não interferiram na resposta ao tratamento. Em relação às anormalidades cromossômicas, a presença de cromossomo Filadélfia, hipodiploia extrema (menos de 44 cromossomos) e presença de anormalidades em 11q23 (gene *MLL*) foram confirmados como fatores de pior prognóstico; enquanto a fusão *TEL-AML1* foi indicativa de melhor prognóstico. Pacientes com t(1;19) submetidos a terapias mais intensivas não apresentaram pior prognóstico. A avaliação da resposta ao tratamento de indução mostrou ser um fator muito importante. A análise evidenciou que pacientes com medula M3 (mais de 25% de blastos) no décimo-quarto dia do tratamento, recebendo terapia mais intensiva apresentaram melhor prognóstico que aqueles com medula M2 (entre 5% e 25% de blastos) que continuaram com a mesma terapia. Sugere-se tratamento mais agressivo tanto para os pacientes com medula óssea M3 quanto para os com M2 no décimo-quarto dia do tratamento de indução. Em relação ao envolvimento do SNC, pacientes com SNC-2 evoluíram da mesma forma que aqueles com SNC-3, necessitando-se mais estudos para avaliar a possibilidade de pacientes SNC-2 e SNC-3 serem tratados da mesma maneira. Este estudo propõe a classificação dos pacientes com LLA em quatro grupos, baixo risco, risco *standard*, alto risco e risco muito alto, com a intenção de selecionar os pacientes que realmente vão se beneficiar de tratamentos mais agressivos. Crianças com hipodiploidia extrema, t(9;22), rearranjo do gene *MLL* e/ou falha na indução seriam consideradas de risco muito alto; as com idade maior

ou igual que 10 anos e/ou contagem de leucócitos maior que 50.000/ μ l seriam de alto risco, idade entre um ano e 9,9 anos com contagem de leucócitos menor que 50.000/ μ l seriam risco *standard* e, se além disto apresentassem t(12;21) ou trissomias dos cromossomos 4, 10 e 17 seriam consideradas de baixo risco para recidiva.

2.10 TRATAMENTO

Houve um desenvolvimento significativo no tratamento da LLA nos últimos 50 anos e, atualmente, a sobrevida livre de eventos, em cinco anos, é de 80% (SILVERMAN et al., 2001; PUI et al., 2004).

Antes de 1950, a leucemia pediátrica não era diferenciada em linfóide ou mielóide e a sobrevida era em torno de três meses. Os óbitos eram causados por hemorragias ou infecções e as transfusões sangüíneas eram o único tratamento disponível na época. Na década de 50 existiram algumas tentativas diferentes para o tratamento das leucemias. Inicialmente foi usado ácido fólico, porém com respostas ruins. Em seguida foi utilizado aminopterina, análogo do metotrexato, que interfere no metabolismo do folato, com remissão temporária da leucemia (FARBER et al.²⁶, apud KERSEY, 1997, p.4243). Ainda nesta década foi iniciada a utilização de 6-mercaptopurina e prednisona, mas sempre como agentes isolados, sem boas respostas (PEARSON et al.²⁷, apud KERSEY, 1997, p.4243; SKIPPER et al.²⁸, apud SIMONE, 2006, p.353). Nas décadas de 60, 70 e 80 outros agentes quimioterápicos,

²⁶ FARBER, S. et al. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-Aminopteroyl-glutamic acid (Aminopterin). **New Engl J Med**, v. 238, p. 787, 1948.

²⁷ PEARSON, O. H.; ELIEL, L. P. Use of primary adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and cortisone in lymphomas and leukemias. **JAMA**, v. 144, p. 1349, 1950.

²⁸ SKIPPER, H. E. et al. Observations on the anticancer activity of 6-mercaptopurine. **Cancer Research**, v. 14, p. 294-98, 1954.

como metotrexato, asparaginase, vincristina, epipodofilotoxinas e antraciclinas, foram incluídos no tratamento e usados conjuntamente (TALLAL et al.²⁹, apud SILVERMAN e SALLAN, 2003, p.1146; JAFFE et al.³⁰, apud SILVERMAN e SALLAN, 2003, p.1146; BLUM e CARTER³¹, apud SILVERMAN e SALLAN, 2003, p.1146); e também foi iniciada terapia específica para tratamento pré-sintomático da leucemia em SNC (NESBIT et al., 1981), com importante melhora na resposta ao tratamento. Além do desenvolvimento de esquemas quimioterápicos e do reconhecimento do SNC como um santuário da doença, a melhora no tratamento de suporte e a aplicação de protocolos conforme grupos de risco são responsáveis pelo aumento da sobrevida das crianças com LLA.

A base do tratamento da LLA consiste de várias fases: a primeira fase é a mais curta, de indução de remissão, seguida de intensificação (consolidação), fase de manutenção (terapia prolongada) e tratamento específico para leucemia no SNC.

2.10.1 Indução da Remissão

O objetivo principal desta fase é induzir a remissão completa com a restauração da hematopoese normal, ou seja, reduzir a quantidade de blastos leucêmicos a um nível clínico e hematológico não detectável. A remissão hematológica é definida como ausência de blastos no sangue periférico, contagem de granulócitos acima de 1000/ μ l, contagem de plaquetas acima de 100.000/ μ l e aspirado de medula óssea com 5% ou menos de blastos. Remissão completa é caracterizada como ausência de qualquer sinal ou sintoma de doença extramedular

²⁹ TALLAL, L. et al. E. coli L-asparaginase in the treatment of leukemia and solid tumors in 131 children. **Cancer**, v.25, p. 306-20, 1970.

³⁰ JAFFE et al. Comparison of daily and twice-weekly schedule of L-asparaginase in childhood leukemia. **Pediatrics**, v.49, p. 590-95, 1972.

³¹ BLUM R., CARTER S. Adriamycin. A new anticancer drug with significant clinical activity. **Ann Intern Med**, v.80, p. 249-59, 1974.

além dos critérios acima.

O esquema de indução inclui o uso de corticóides, vincristina, asparaginase e doxorrubicina. O objetivo da associação de quatro drogas é prevenir a ocorrência de resistência a drogas pelos clones leucêmicos através de destruição rápida e de grande quantidade de blastos. A duração desta fase varia de quatro a seis semanas e as taxas de remissão completa são de 97% a 99% (PUI et al., 1998).

2.10.2 Tratamento do SNC

Todos os esquemas de tratamento da LLA incluem terapia pré-sintomática direcionada para infiltração leucêmica no SNC. Normalmente esta terapia é iniciada na fase de indução e o tratamento definitivo começa logo após a remissão completa da doença. A primeira modalidade de tratamento que preveniu a recidiva da leucemia no SNC foi a irradiação craniana. Como a radioterapia pode causar neurotoxicidade importante e, ocasionalmente, ser a causa de tumores cerebrais, em muitos protocolos utiliza-se quimioterapia intratecal e sistêmica logo no início do tratamento (PUI et al., 1998). Muitos estudos têm mostrado que é possível reduzir ou até eliminar a irradiação craniana do tratamento da LLA (NACHMAN et al., 1998; PUI et al., 2000; SCHRAPPE et al., 2000; GUSTAFSSON et al., 2000). Os resultados da quimioterapia são excelentes, com taxas de recidiva em SNC de 2% ou menos (CORTES et al., 1995; CONTER et al., 1997; NACHMAN et al., 1998, PUI et al., 1998; MOGHRABI et al., 2007). Para pacientes com envolvimento de SNC ao diagnóstico é necessário realizar esquema quimioterápico mais intensivo, pois o risco de recidiva sistêmica e no SNC é maior (BURGER et al., 2003).

2.10.3 Intensificação

Um dos objetivos da fase de intensificação é ajustar a intensidade do

tratamento baseado no risco de recidiva. Em alguns protocolos uma parte da intensificação é realizada logo após a indução de remissão e em outros ela é feita depois de um curto período de terapia menos intensiva (SILVERMAN e SALLAN, 2003).

Esta fase inclui o uso de várias drogas como metotrexato, mercaptopurina, asparaginase, epipodofilotoxina, citarabina, dexametasona, doxorubicina, tioguanina e ciclofosfamida. Este componente do tratamento contribuiu significativamente para melhorar a sobrevida das crianças com LLA (PUI et al., 2004).

2.10.4 Manutenção

Praticamente todos os protocolos incluem um período prolongado de terapia menos intensiva até completar, no mínimo, dois anos de duração. Talvez a exposição prolongada a agentes quimioterápicos seja necessária para destruir as células leucêmicas residuais, que se dividem mais lentamente ou suprimir o crescimento destas, permitindo que ocorra sua morte celular programada (PUI et al., 1994). Em estudo clínico realizado em 1996, pelo *Childhood ALL Collaborative Group*, foi evidenciada alta taxa de recidiva após o término do tratamento, quando a duração da fase de manutenção foi diminuída para 18 meses, e também não houve melhora da sobrevida quando o tratamento foi prolongado por mais de três anos. Portanto, o tempo total do tratamento para LLA deve ter duração de dois a três anos, no máximo (PUI e EVANS, 1998).

Na maioria dos protocolos é realizado metotrexato semanalmente associado a mercaptopurina diária. Adição de pulsos intermitentes de dexametasona e vincristina mostraram melhores resultados (*Childhood ALL Collaborative Group*, 1996).

Os protocolos pediátricos mostraram ter grande eficácia no tratamento da

LLA, atingindo taxas de sobrevida de 80%. Estudos na tentativa de descobrir fatores causais da leucemia, assim como o aprimoramento na avaliação das alterações cromossômicas e identificação de grupos de risco são necessários para melhorar ainda mais estas taxas.

2.11 RECIDIVA

Aproximadamente 20% a 30% das crianças que atingem remissão completa avaliada ao término da indução apresentam recidiva da doença. A maioria das recidivas ocorre na medula óssea e em 70% a 90% dos casos existe chance de nova remissão. Quando esta é conseguida, o paciente deve ser encaminhado para realização de transplante de medula óssea (SILVERMAN e SALLAN, 2003).

Recidiva extramedular isolada pode ocorrer nos testículos e no SNC. A recidiva isolada nos testículos é rara e, quando ocorre tardiamente, as chances de sobrevida chegam a 80%, se tratada com quimioterapia sistêmica e radioterapia local (UDERZO et al., 1990). No SNC, as recidivas correspondem a menos de 10% dos casos. A remissão é conseguida em aproximadamente 90% dos casos com terapia direcionada para SNC. A maioria dos pacientes que não são tratados com esquemas quimioterápicos intensivos apresentam recidiva na medula óssea. Crianças com recidiva isolada de SNC apresentam taxas de sobrevida entre 45% e 70% (WINICK et al., 1993; RITCHEY et al., 1999).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PACIENTES

Foram selecionados todos os pacientes com diagnóstico de LLA, entre 0 e 15 anos de idade, que apresentavam alguma alteração cromossômica, numérica ou estrutural, identificada por CC, ou com cariótipo normal, com 20 ou mais metáfases analisadas.

Esta pesquisa foi realizada de maneira retrospectiva, através dos resultados da CC registrados nos livros da Unidade de Citogenética Humana do Laboratório de Imunogenética do Hospital de Clínicas da UFPR, no período de 1986 (quando foi iniciada a realização da CC neste laboratório) até outubro de 2006.

Foram incluídos na pesquisa 142 pacientes com as características citadas acima. Nos prontuários de 9 pacientes não foram encontradas informações suficientes para inclusão no estudo, sendo, portanto, excluídos. Foram analisados, assim, 133 pacientes, 114 com resultado de CC obtido ao diagnóstico e 19 com resultados de CC obtidos na ocasião da recidiva ou após o início do tratamento.

3.2 CITOGENÉTICA CONVENCIONAL

A análise dos exames dos pacientes com LLA foi realizada pelo método de citogenética convencional (CC), na Unidade de Citogenética Humana do Laboratório de Imunogenética do Hospital de Clínicas da UFPR, com supervisão técnica do prof. Iglénir João Cavalli.

3.2.1 CULTURA E PREPARAÇÃO CITOLÓGICA

Para a obtenção dos cromossomos metafásicos em amostras de medula óssea, foi utilizado o método descrito por Raimondi et al.(1999), com modificações.

O material enviado foi inoculado em dois frascos de cultura celular, contendo meio RPMI 1640-Gibco, em meio estéril, no fluxo laminar. Este material foi suplementado com 20% de soro bovino fetal e incubado em estufa por 24 horas a 37° C. Após este período, o protocolo de preparação citológica seguiu três etapas principais: interrupção mitótica, quando era adicionado 0,1 ml de colchicina (Sigma- 16 ug/ml) na cultura, que era mantida a 37° C por 40 minutos; tratamento hipotônico com solução de cloreto de potássio (KCl a 0,75M, a 37° C por 20 minutos) e fixação do material com 3 volumes de metanol para 1 ácido acético glacial recém preparado. Duas gotas da suspensão foram distribuídas em lâminas e, após secagem, em temperatura ambiente, as lâminas foram armazenadas em estufa a 37° C, para obtenção das bandas G (Veiga, 2003).

3.2.2 Bandeamento Cromossômico GTG

Foi utilizada a técnica de Scheres (1972), com modificações. O material foi desidratado em soluções decrescentes de álcoois (96%, 85%, 70%) e, posteriormente, hidratado em tampão fosfato com pH de 6,8 por 5 minutos. A seguir, as lâminas foram imersas em solução de tripsina a 0,02% e coradas em solução de Giemsa diluída em tampão fosfato a 0,06M (14,2 g/l de NaHPO₄ + 8,16 g/l de KH₂PO₄), com pH de 6,8, na proporção de 1:30, durante 5 minutos. Após este processo, as lâminas foram lavadas com água destilada e secadas em temperatura ambiente (Veiga, 2003 ; Jamur, 2005).

3.2.3 Análise

Após a coloração convencional, em Giemsa, os cromossomos metafásicos foram contados, diretamente ao microscópio, para estabelecer o número modal. Posteriormente, procedeu-se ao bandeamento GTG e, sempre que possível, um mínimo de 20 metáfases bandeadas foram analisadas em desenhos e fotografias

para a identificação da presença ou ausência de aberrações cromossômicas. Desde 2004 esta análise está sendo feita através de sistema computadorizado. As anormalidades numéricas são consideradas clonais quando há a presença adicional de um mesmo cromossomo em duas ou mais células ou quando um mesmo cromossomo está ausente em pelo menos três células. As anormalidades estruturais são consideradas clonais quando uma mesma aberração está presente em duas ou mais células (ISCN, 2005). Foram considerados normais os casos cuja análise de pelo menos 20 metáfases bandeadas não apresentaram alterações cromossômicas clonais e foram considerados como contendo aberrações, os casos cuja análise demonstraram a presença de pelo menos um clone anormal (Veiga, 2003 ; Jamur, 2005).

3.3 ANÁLISE DOS PRONTUÁRIOS

Foram avaliados os seguintes dados através da revisão dos prontuários : sexo, idade, cor, valores iniciais do hemograma, história e exame físico iniciais, características da imunofenotipagem, presença de alterações cromossômicas, ocorrência de recidiva e óbito.

A dissertação foi escrita conforme as normas para apresentação de documentos científicos, UFPR, 2002.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram coletados pelo pesquisador e digitados na planilha eletrônica Microsoft Excel® e, posteriormente, conferidos e transferidos para o software de estatística Statistica (Statsoft®) (licença Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente – UFPR).

Na análise exploratória e descritiva inicial dos dados, as variáveis contínuas de distribuição simétrica foram testadas para possíveis diferenças entre os

subgrupos de estudo pelo teste paramétrico t de Student. As variáveis de distribuição assimétrica, por sua vez, pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Para as variáveis categóricas foram aplicados os testes exato de Fisher e qui-quadrado de Pearson na dependência do tamanho e número dos subgrupos estudados.

Curvas de Kaplan-Meier, no modelo de análise de sobrevivência, foram construídas para estimar as taxas de sobrevida global e de acordo com os subgrupos estudados.

Para todos os testes foi considerado o nível mínimo de significância de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES

A idade dos pacientes variou de dois meses a 14 anos, com média de cinco anos e dez meses; sendo que 78% dos pacientes apresentavam idade entre um e dez anos, 4% menos de 12 meses e 18% idade igual ou maior que dez anos. Pacientes com idade entre dois e cinco anos, considerado o pico de incidência da LLA, representaram 38% da amostra (Tabela 5).

TABELA 5. DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES CONFORME FAIXA ETÁRIA

IDADE	≤ 1 ANO	ENTRE 1 E 10 ANOS	≥ 10 ANOS
Número de pacientes	5	104	24
Porcentagem (%)	4	78	18

Setenta e um pacientes eram do sexo masculino (53%) e 62 (47%) do sexo feminino; 89% eram brancos e 11%, não brancos (Tabelas 6 e 7).

TABELA 6. DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES CONFORME O SEXO

SEXO	MASCULINO	FEMININO
Número de pacientes	71	62
Porcentagem (%)	53	47

TABELA 7. DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES CONFORME A COR

COR	BRANCA	NÃO-BRANCA
Número de pacientes	118	15
Porcentagem (%)	89	11

O tempo do início dos sintomas até o diagnóstico foi, em mediana, de 30 dias, variando de 0 a 150 dias, considerando um caso onde o diagnóstico foi

realizado por hemograma de rotina em paciente assintomático com Síndrome de Down; o maior período de sintomas foi de 150 dias (Tabela 8).

TABELA 8. TEMPO DE INÍCIO DOS SINTOMAS

TEMPO EM DIAS	< 15	≥ 15 A 30	> 30	SEM INFORMAÇÃO
Número de pacientes	34	57	36	6
Porcentagem (%)	25,5	43	27	4,5

Na história clínica, os sinais e sintomas mais comuns foram febre (58%), palidez (45%), dor nos MMII (39%) e astenia (38%), seguidos de inapetência (26%), aparecimento de equimoses (22%), dor abdominal (22%), perda de peso (18%), sangramento (14%), tosse (11%) e linfonodomegalia (9%). O sangramento mais comum foi epistaxe, em 63% dos casos (Tabela 9).

TABELA 9. SINAIS E SINTOMAS MAIS COMUNS

SINAIS E SINTOMAS	NÚMERO DE PACIENTES	PORCENTAGEM (%)
Febre	77	58
Palidez	60	45
Dor nos MMII	52	39
Astenia	51	38
Inapetência	34	26
Aparecimento de equimoses	29	22
Dor abdominal	29	22
Perda de peso	24	18
Sangramentos	19	14
Tosse	15	11
Linfonodomegalia	12	9

No exame físico, ao diagnóstico, os achados mais freqüentes foram palidez (81%), hepatomegalia (78%), esplenomegalia (63%), linfonodomegalia (52%),

petéquias (25%) e equimoses (17%) (Tabela 10). Em 15% dos pacientes o fígado era palpável a mais de 5 cm abaixo da borda costal direita e em 19% o baço era palpável a mais de 5 cm abaixo da borda costal esquerda.

TABELA 10. ACHADOS MAIS FREQUENTES NO EXAME FÍSICO

ACHADOS NO EXAME FÍSICO	NÚMERO DE PACIENTES	PORCENTAGEM (%)
Palidez	107	81
Hepatomegalia	104	78
Esplenomegalia	84	63
Linfonomegalia	69	52
Petéquias	33	25
Equimoses	22	17

Em relação ao hemograma, ao diagnóstico, o valor de hemoglobina variou de 2,7 a 16 g/dl, com mediana de 7,5 g/dl (desvio padrão = 2,6 g/dl), sendo menor ou igual a 10 g/dl em 79% dos casos (Tabela 11).

TABELA 11. VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DE HEMOGLOBINA AO DIAGNÓSTICO

VALOR DE HEMOGLOBINA (G/DL)	NÚMERO DE PACIENTES	PORCENTAGEM (%)
Menor que 7	50	38
≥ 7 a ≤ 10	55	41
Maior que 10	28	21

O número de leucócitos variou de 600 a 543.400/ μ l, com mediana de 14.700/ μ l (desvio padrão = 88.358/ μ l), sendo que 57% dos pacientes apresentavam contagem de leucócitos igual ou maior que 10.000/ μ l (Tabela 12).

TABELA 12. CONTAGEM DE LEUCÓCITOS AO DIAGNÓSTICO

CONTAGEM DE LEUCÓCITOS	NÚMERO DE PACIENTES	PORCENTAGEM (%)
Menor que 10.000/ μ l	57	43
$\geq 10.000/\mu$ l a $\leq 50.000/\mu$ l	41	31
Maior que 50.000/ μ l	35	26

A porcentagem de blastos no sangue periférico variou de 0 a 99%, com mediana de 45% (desvio padrão = 36,9%); o número de plaquetas variou de 2.000 a 760.000/ μ l, com mediana de 44.000/ μ l (desvio padrão = 116.930/ μ l), sendo que em 73% dos casos o número de plaquetas estava abaixo de 100.000/ μ l (Tabela 13).

TABELA 13. CONTAGEM DE PLAQUETAS AO DIAGNÓSTICO

CONTAGEM DE PLAQUETAS	NÚMERO DE PACIENTES	PORCENTAGEM (%)
Menor que 100.000/ μ l	97	73
Maior ou igual a 100.000/ μ l	36	27

No momento do diagnóstico, O SNC estava envolvido em 5 pacientes (4%) e em nenhum caso houve envolvimento testicular inicial.

Em relação à linhagem da LLA, 93% dos pacientes apresentavam LLA de linhagem B e 7%, LLA de linhagem T. Em 91% das LLA de linhagem B e em 44% das de linhagem T houve expressão de CD10 (Tabela 14).

TABELA 14. DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES CONFORME LINHAGEM DA LLA

TIPO DE LLA	NÚMERO DE PACIENTES	PORCENTAGEM (%)
Pré-B precoce	97	73
Pré-B	10	7,5
B transicional	2	1,5
B madura	4	3
T	9	7
Não classificável	11	8

4.2 FREQUÊNCIA DAS ANORMALIDADES CROMOSSÔMICAS

Dos 133 pacientes, 114 apresentavam resultado de citogenética da medula óssea ao diagnóstico e 19 apenas o resultado de medula óssea coletada na recidiva da LLA ou após o início do tratamento.

Considerando os 114 pacientes com resultado de CC do diagnóstico, pseudodiploidia foi verificada em 49 pacientes (43%); hiperdiploidia entre 47 e 50 cromossomos, em 22 pacientes (19%); hiperdiploidia entre 51 e 68 cromossomos, em 18 pacientes (16%); hipodiploidia em 10 pacientes (9%) e 22 pacientes (19%) apresentavam citogenética normal. Nenhum paciente apresentava mais de 68 cromossomos (Tabela 15).

TABELA 15. RESULTADOS DA CC NOS 114 PACIENTES COM EXAME REALIZADO AO DIAGNÓSTICO

RESULTADO DA CC	NÚMERO DE PACIENTES	PORCENTAGEM
Citogenética Normal	22	19
Hiperdiploidia 47-50 crom	22	19
Hiperdiploidia 51-68 crom	18	16
Pseudodiploidia	49	43
Hipodiploidia	10	9

Entre os pacientes com hiperdiploidia, 39% apresentavam, além de trissomias, alterações estruturais. Entre os pacientes com hipodiploidia alterações estruturais estavam presentes em 50% dos casos. Sete pacientes apresentaram dois clones diferentes, sendo quatro com um clone hiperdiplóide entre 47 e 50 cromossomos e um clone pseudodiplóide; um paciente com um clone hiperdiplóide entre 51 e 68 cromossomos e um clone pseudodiplóide; um paciente apresentava um clone hipodiplóide e um pseudodiplóide; e um caso apresentava um clone hiperdiplóide entre 47 e 50 cromossomos e um clone hipodiplóide.

Entre os 19 pacientes com resultado de citogenética realizada por ocasião da recidiva ou após o início do tratamento, 37% apresentavam hiperdiploidia entre 51 e 68 cromossomos, 32% pseudodiploidia, 21% hiperdiploidia entre 47 e 51 cromossomos e 10% citogenética normal.

Quanto aos pacientes com hiperdiploidia, 61% apresentavam apenas alterações numéricas. A trissomia mais freqüente foi a do cromossomo 21 (42% dos casos), seguida dos cromossomos 22 (26%), 4 (24%), 8 (24%), 6 (21%), 17 (18%), 20 (18%), 10 (16%), 18 (16%), X (11%), 14 (8%) e 5 (8%). Nos pacientes com hipodiploidia, a monossomia mais comum foi a do cromossomo 22, em 50% dos casos, seguida da monossomia dos cromossomos 20 (40%), 21 (40%), 14 (30%), X (20%) e 2 (20%) (Tabela 16).

Em relação às alterações estruturais nos pacientes com citogenética realizada ao diagnóstico, 11 pacientes apresentaram cromossomos marcadores e seis, isocromossomos.

Entre as translocações, a mais freqüente foi a $t(4;11)(q21;q23)$, em 6% dos casos, seguida da $t(1;19)(q23;p13)$, em 4,5% dos pacientes. A $t(9;22)(q34;q11)$ estava presente em apenas um paciente, assim como a $t(12;21)(p12;q22)$.

TABELA 16. FREQUÊNCIAS DOS GRUPOS DE PACIENTES PELO NÚMERO MODAL DE CROMOSSOMOS, FREQUÊNCIAS DAS ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS E DISTRIBUIÇÕES DAS TRISSOMIAS E MONOSSOMIAS EM CADA GRUPO.

GRUPO POR NÚMERO MODAL (%)	ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS (%)	TRISSOMIAS E MONOSSOMIAS
Hipodiploidia (9)	50	-22,-21,-20,-14,-2,-X,-4,-5,-8,-13,-15,-16,-18
Hiperdiploidia entre 47-50 crom (19)	25	+21,+8,+22,+4,+20,+9,+6,+X,+18 +17,+10,+1,+2,+16
Hiperdiploidia entre 51-68 crom (16)	11	+21,+4,+6,+22,+14,+18,+17,+10, +20,+11,+X,+9,+5,+19,+13,+15, +8,+7,+12,+16,+1

Adições de cromossomos ocorreram em nove pacientes (8%) e deleções em 23 casos (20%). Anormalidades em 6q estavam presentes em 6% dos casos, anormalidades em 12p em 5% e em 9q em 2% dos pacientes (Tabela 17).

Em relação aos 19 pacientes com resultado de citogenética, por ocasião da recidiva ou após início do tratamento, as alterações encontradas mais comumente foram: del(11)(q23) em três casos (16%), cromossomos marcadores em três casos (16%) e t(9;22) em dois pacientes (11%) (Tabela 18).

TABELA 17. ACHADOS DE CC AO DIAGNÓSTICO DOS 114 PACIENTES COM LLA

NÚMERO DE CASOS	PORCENTAGEM (%)	ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS
7	6,1	t(4;11)(q21;q23)
5	4,4	t(1;19)(q23;p13)
2	1,8	t(12;15)(p13;q15)
1	0,9	t(9;22)(q34;q11)
1	0,9	t(12;21)(p12;q22)
1	0,9	t(8;14)(q24;q11)
1	0,9	t(1;7)(q24;q36)
1	0,9	t(5;9)(q35;p13)
1	0,9	t(3;3)(q21;q26)
1	0,9	t(1;12)(q21;q24)
1	0,9	t(7;12)(p22;q10)
2	1,8	add(7)(p22)
2	1,8	add(17)(p12-q25)
1	0,9	add(11)(p?)
1	0,9	add(15)(q15)
1	0,9	add(22)(p11)
3	2,6	del(7)(q21-q22-q32)
3	2,6	del(2)(p16-p21)
3	2,6	del(8)(p11-p12-p?)
2	1,8	del(11)(q21-q23)
2	1,8	del(18)(p11)
2	1,8	del(5)(q13)
2	1,8	del(4)(q26-q2?)
2	1,8	del(13)(q13)
1	0,9	del(1)(p22)
1	0,9	del(X)(q22)
1	0,9	del(17)(p12)
1	0,9	del(10)(p12)
1	0,9	del(14)(q23)
1	0,9	dup(1)(q35)
1	0,9	der(19)
8	7	Anormalidades 12p
7	6,1	Anormalidades 6q
2	1,8	Anormalidades 1q
1	0,9	Anormalidades 9p

TABELA 18. ACHADOS DE CC NOS 19 PACIENTES COM RESULTADO DA RECIDIVA OU APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO

NÚMERO DE CASOS	PORCENTAGEM (%)	ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS
3	16	del(11)(q23)
2	11	t(9;22)(q34;q11)
1	5	t(1;7)(q24;q36)
1	5	del(2)(p21)
1	5	del(2)(q3)
1	5	del(18)(q22)
1	5	del(4)(q2?)
1	5	del(8)(p1)
1	5	add(7)(p22)
1	5	dup(1)(q35)
1	5	der(7)
1	5	Anormalidade 6q
1	5	Anormalidade 1q

4.3 TRATAMENTO

Os protocolos de tratamento não foram analisados neste estudo. Nas instituições onde os pacientes foram tratados são utilizados protocolos intensivos, adaptados às variáveis de risco (contagem inicial de leucócitos, idade, infiltração do SNC e imunofenotipagem).

4.4 RECIDIVAS E ÓBITOS

Dos 133 pacientes, 42 apresentaram recidiva da doença (31%), sendo em 27 (20%) uma recidiva, em 12 (9%) duas recidivas e três (2%) apresentaram três recidivas. Desses 42 pacientes, 26 foram a óbito (62%). Todos que apresentaram

três recidivas faleceram. Oito dos 12 casos com duas recidivas e 14 dos 27 com uma recidiva também foram a óbito. O tempo entre o diagnóstico e a recidiva variou de dois meses a sete anos para a primeira recidiva, dez meses a onze para a segunda recidiva e dois anos a 12 anos para a terceira recidiva.

Considerando todos os pacientes, ocorreram 37 óbitos (28%), sendo 28 (76%) causados pela doença, 8 (21%) por outros motivos, como infecção e em um caso (3%) não há relato da causa da morte no prontuário. O tempo para a ocorrência do óbito variou de nove dias a 12 anos e seis meses do diagnóstico (Tabela 19).

TABELA 19. OCORRÊNCIA DE RECIDIVAS E ÓBITOS ENTRE OS 133 PACIENTES

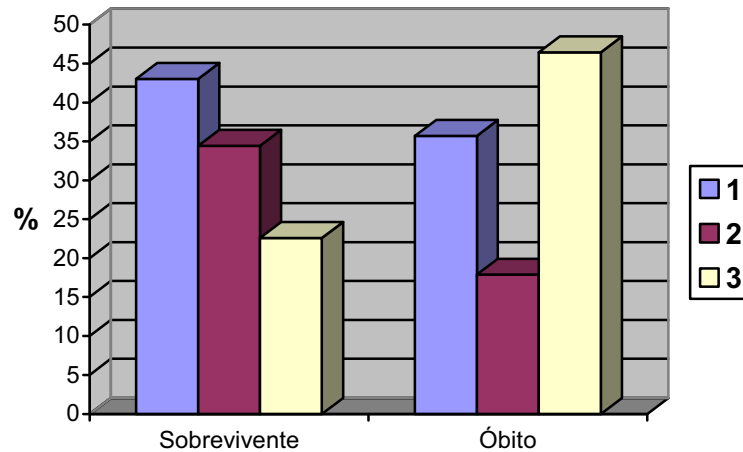
	NÚMERO DE PACIENTES	PORCENTAGEM (%)
Total de Recidivas	42	31
1 Recidiva	27	20
2 Recidivas	12	9
3 Recidivas	3	2
Total de Óbitos	37	28

4.5 ASSOCIAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS COM RECIDIVA E ÓBITO

Comparando-se os pacientes sobreviventes com os que foram a óbito, observou-se que o número médio de blastos foi superior naqueles que morreram (mediana de 74, variando de 0 a 98% no grupo de pacientes que foi a óbito; mediana de 34,5 nos pacientes sobreviventes, variando de 0 a 99%). Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p = 0,01$).

Em relação à contagem inicial de leucócitos, a frequência de número de leucócitos superior a 50.000/ μ l foi maior no grupo de pacientes que foram a óbito ($p = 0,03$) (Gráfico 1).

GRÁFICO 1. RELAÇÃO DA CONTAGEM INICIAL DE LEUCÓCITOS NO GRUPO DE PACIENTES SOBREVIVENTES E NO DE PACIENTES QUE FORAM A ÓBITO



Nota : 1- Contagem de leucócitos <10.000/μl
 2- Contagem de leucócitos ≥10.000/μl a ≤ 50.000/μl
 3- Contagem de leucócitos > 50.000/μl

Dos 4 pacientes que apresentaram envolvimento do SNC, 3 foram a óbito (p = 0,01).

A avaliação da relação entre o óbito e o tipo da LLA ficou prejudicada pelo pequeno número de pacientes com LLA de linhagem T.

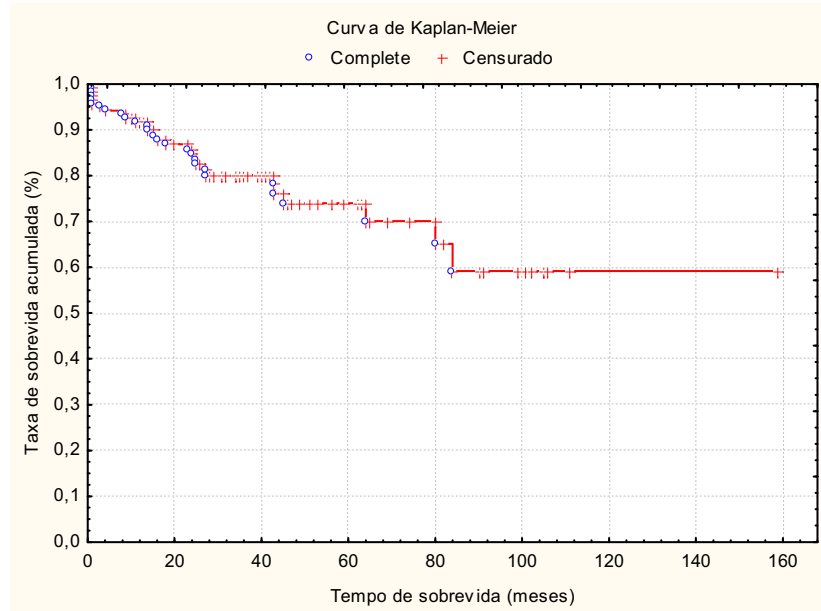
4.6 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA (CURVAS DE KAPLAN-MEIER)

Foram construídas as Curvas de Kaplan-Meier, no modelo de análise de sobrevivência, com a finalidade de estimar a taxa de sobrevida acumulada global e de acordo com o sexo, idade, contagem inicial de leucócitos, classificação citogenética e presença ou não da t(4;11)(q21;q23). Para esta análise foi excluído um paciente, considerado como *outlier*, cujo óbito ocorreu após 3 recidivas com 150 meses de idade.

A sobrevida global em cinco anos foi de 73%, e em 10 anos, de 60%

(Gráfico 2).

GRÁFICO 2. CURVA DE KAPLAN-MEIER PARA SOBREVIDA GLOBAL



Considerando-se o sexo, observa-se que a taxa de sobrevivência dos meninos tende a ser melhor até cerca de 110 meses, porém sem diferença estatisticamente significativa. Depois de 110 meses não há como comparar a sobrevivência entre meninos e meninas devido à presença apenas de pacientes do sexo feminino (Gráfico 3).

Em relação à idade, pacientes com idade menor que um ano apresentaram pior prognóstico. Pacientes com idade ≥ 1 ano e ≤ 10 anos tiveram taxas de sobrevivência melhores (Gráfico 4).

GRÁFICO 3. CURVA DE KAPLAN-MEIER COMPARANDO SOBREVIDA ENTRE OS SEXOS

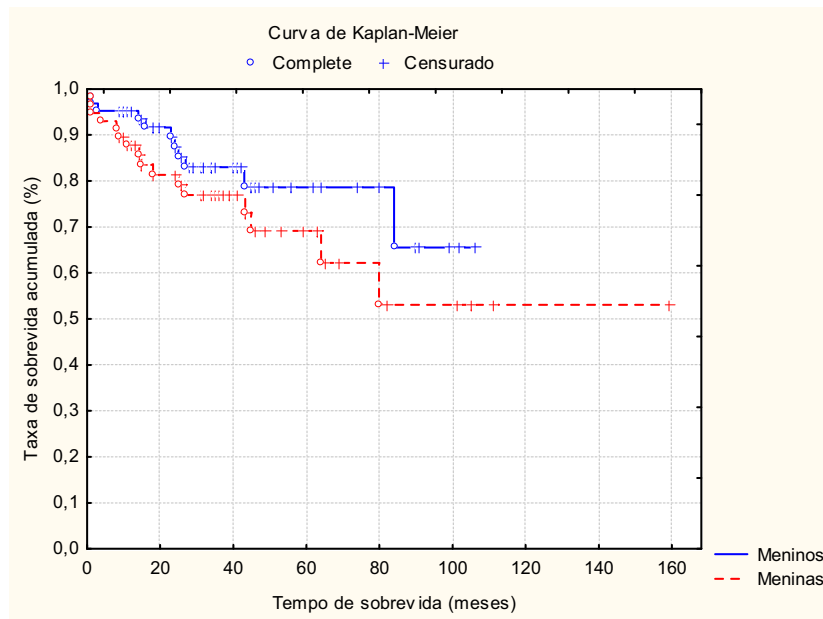
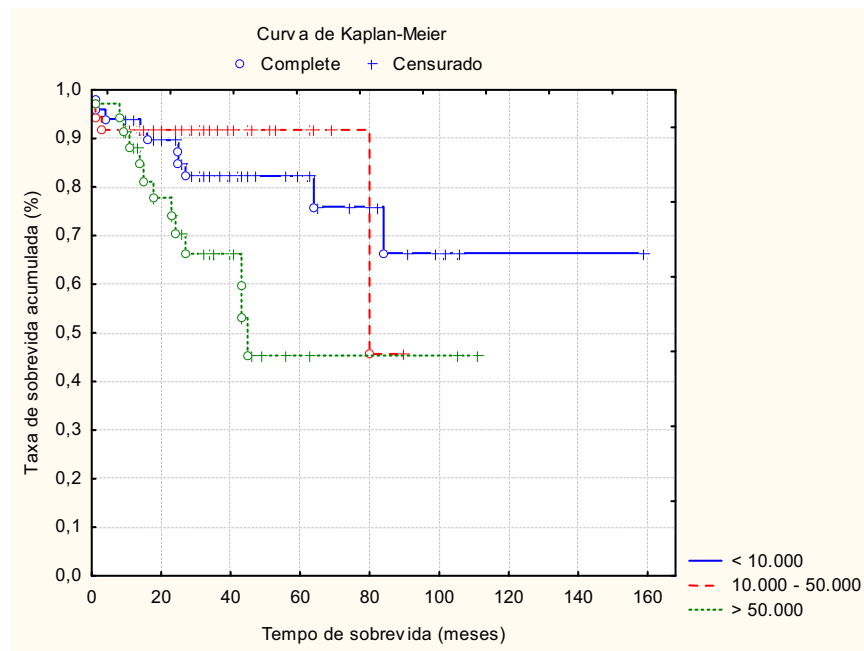


GRÁFICO 4. CURVA DE KAPLAN-MEIER COMPARANDO SOBREVIDA EM RELAÇÃO À IDADE



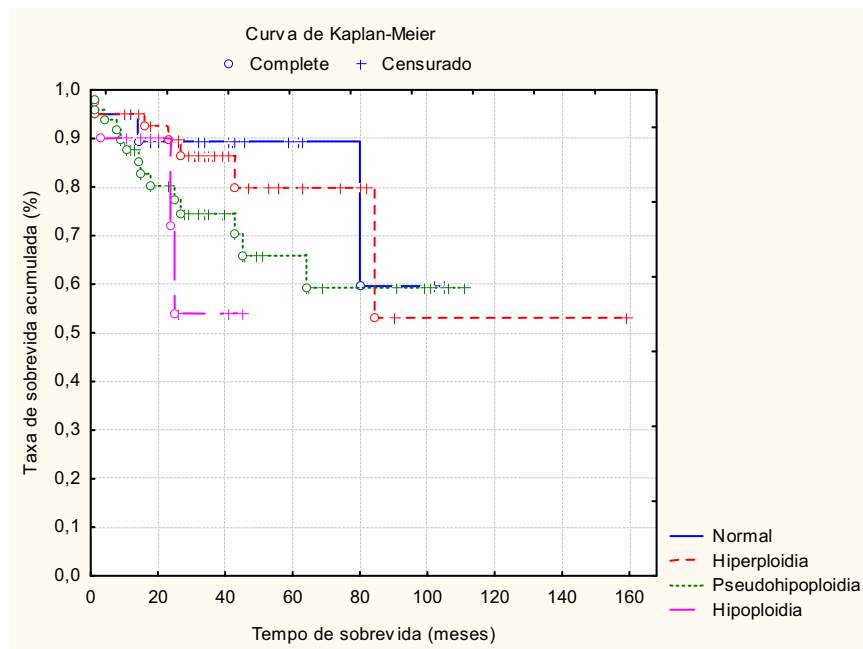
Ao serem avaliados, levando em consideração a contagem inicial de leucócitos, os pacientes com contagem de leucócitos acima de 50.000/ μ l apresentaram taxa de sobrevivência menor (Gráfico 5).

GRÁFICO 5. CURVA DE KAPLAN-MEIER COMPARANDO SOBREVIDA EM RELAÇÃO À CONTAGEM INICIAL DE LEUCÓCITOS



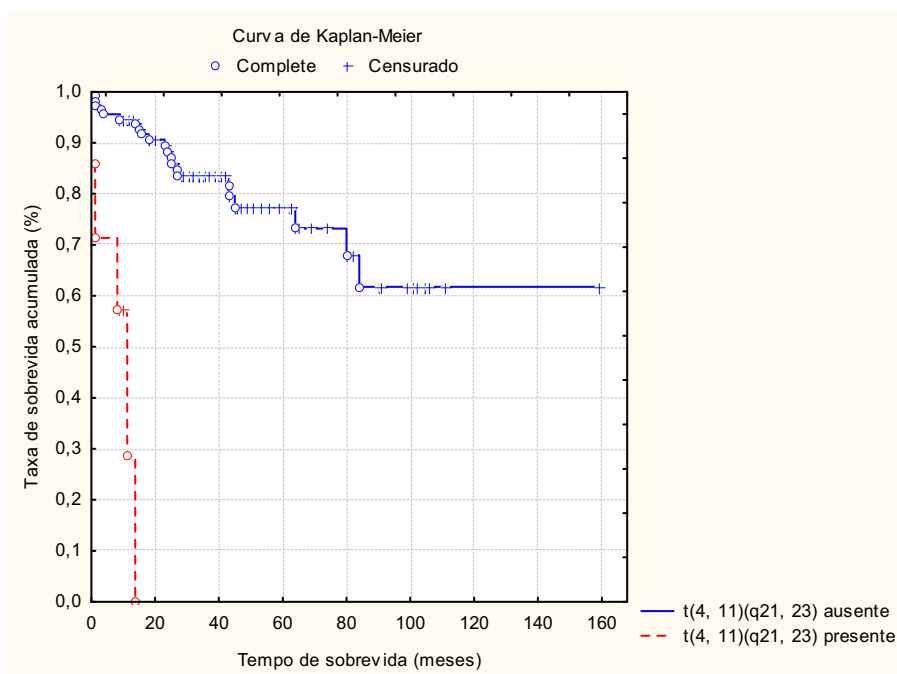
Considerando a classificação dos pacientes segundo o resultado da citogenética (normal, hiperdiploidia, pseudodiploidia e hipodiploidia), a sobrevivida foi menor nos pacientes com hipodiploidia e as crianças com resultado de citogenética considerado normal apresentaram melhor prognóstico (Gráfico 6).

GRÁFICO 6. CURVA DE KAPLAN-MEIER COMPARANDO SOBREVIDA EM RELAÇÃO À CLASSIFICAÇÃO CITOGENÉTICA



Analisando a presença ou não da $t(4;11)(q21;q23)$, observou-se que esta translocação é um fator de pior prognóstico, com taxas de sobrevivência menores. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p = 0,0002$) (Gráfico 7).

GRÁFICO 7. CURVA DE KAPLAN-MEIER COMPARANDO SOBREVIDA DOS PACIENTES COM OU SEM A T(4;11)(Q21;Q23)



4.7 ANÁLISE MULTIVARIADA (REGRESSÃO DE COX)

Para identificar as variáveis independentes de maior risco para as menores taxas de sobrevivida, foi utilizado o modelo de Regressão de Cox.

Considerando as variáveis independentes idade, sexo, contagem inicial de leucócitos, ocorrência de recidiva e anormalidades identificadas no exame de citogenética observa-se que a ocorrência de recidiva foi a variável selecionada como de maior risco ($e^b = 8,23$; $p < 0,001$) (Tabela 20).

TABELA 20. VARIÁVEIS ANALISADAS POR REGRESSÃO DE COX

VARIÁVEL	COEFICIENTE DE REGRESSÃO	ERRO PADRÃO	RISCO (E^B)
Idade (meses)	-0,003391	0,004728	0,996615
Sexo	0,298403	0,402395	1,347705
Contagem inicial de leucócitos	0,000005	0,000002	1,000005
Recidiva	2,108710	0,498030	8,237604
Citogenética	0,276340	0,405979	1,318297

Quando a variável - anormalidades no exame de citogenética - foi substituída pela alteração específica representada pela t(4;11)(q21;q23), observa-se que este tipo de translocação foi selecionado como de maior risco ($e^b = 9,25$; $p < 0,001$) seguido pela ocorrência de recidiva ($e^b = 6,59$; $p < 0,001$) (Tabela 21).

TABELA 21. ANÁLISE DA T(4;11) POR REGRESSÃO DE COX

VARIÁVEL	COEFICIENTE DE REGRESSÃO	ERRO PADRÃO	RISCO (E^B)
Idade (meses)	-0,002933	0,004725	0,997072
Sexo	0,319325	0,397169	1,376198
Contagem inicial de leucócitos	0,000002	0,000002	1,000002
Recidiva	1,886293	0,491694	6,594878
t(4;11)(q21;q23)	2,225669	0,690020	9,259676

5 DISCUSSÃO

Sabe-se que a LLA atinge seu pico de incidência entre 2 e 5 anos de idade. Neste estudo, 78% dos pacientes apresentavam entre um ano e dez anos, sendo 38% entre dois e cinco anos, e aqueles com idade abaixo de um ano apresentaram pior prognóstico, concordando com relatos da literatura (BIONDI et al., 2000; SILVERMAN et al., 2001). Pérez-Vera et al., em 2001, no México, encontraram 78,5% dos pacientes nesta mesma faixa etária e Udayakumar et al., em 2007, em Oman, 76,5% (Tabela 22).

TABELA 22. COMPARAÇÃO DAS PORCENTAGENS DE PACIENTES COM IDADE ENTRE 1 E 10 ANOS

AUTOR	ANO	NÚMERO TOTAL DE PACIENTES	PORCENTAGEM ENTRE 1 E 10 ANOS (%)
Pérez-Vera et al.	2001	150	78,5
Udayakumar et al.	2007	47	76,5
Lichtvan	2007	133	78

A LLA acomete predominantemente o sexo masculino, como evidenciado por Petkovic et al., em 1996, na Croácia, com 55,7% dos pacientes sendo do sexo masculino. Frequências variáveis são descritas por diferentes autores, como Chessells et al., em 1997, na Inglaterra, com 57,1%; Ma et al., em 1997, na China, com 65,7%; Pérez-Vera et al., em 2001, com 63% e Udayakumar et al., em 2007, com 63,8%. Neste estudo, 53,4% dos casos eram do sexo masculino, sem diferença estatisticamente significativa entre os sexos em relação ao prognóstico (Tabela 23).

TABELA 23. FREQUÊNCIA DO SEXO MASCULINO EM PACIENTES COM LLA

AUTOR	ANO	NÚMERO TOTAL DE PACIENTES	PORCENTAGEM DE PACIENTES DO SEXO MASCULINO (%)
Petkovic et al	1996	70	55,7
Chessells et al	1997	1612	57,1
Ma et al	1997	73	65,7
Pérez-Vera et al	2001	150	63
Udayakumar et al	2007	47	63,8
Lichtvan	2007	133	53,4

A cor branca foi predominante neste estudo, correspondendo a 89% dos casos. Pollock et al., em 2000, analisaram 5086 crianças com LLA e constataram que 79,8% delas eram brancas.

Considerando o tempo de início dos sintomas até o diagnóstico, sinais de infecção (35%) e equimoses (29%) foram as queixas que mais rapidamente levaram os pacientes a algum serviço médico (menos de 15 dias), enquanto pacientes com dor óssea (58%) esperaram mais de 30 dias para serem levados para consulta. Resultados semelhantes foram encontrados por Lopes e Mendes, do Serviço de Pediatria do Hospital A. C. Camargo, em São Paulo, 2000.

Entre as queixas apresentadas pelos pacientes incluídos neste estudo, a febre foi a mais comum (58%), seguida de palidez (45%), dor óssea (39%), astenia (39%), inapetência (26%) e emagrecimento (18%). Ma et al., em 1997, avaliaram 73 crianças e entre as queixas principais estavam febre (60%), astenia (50%) e emagrecimento (26%). Lopes e Mendes analisaram 392 crianças com LLA no período de 1980 a 1996 e os sintomas mais frequentes encontrados foram febre (55,1%), palidez (54,3%) e dor óssea (30,3%). Margolin e Poplack, 2005, nos Estados Unidos da América (EUA), relataram febre em 61% dos pacientes e dor óssea em 23% (Tabela 24).

TABELA 24. COMPARAÇÃO ENTRE AS FREQUÊNCIAS DAS QUEIXAS APRESENTADAS PELOS PACIENTES COM LLA (%)

QUEIXA	LICHTVAN, 2007	MA ET AL., 1997	LOPES E MENDES, 2000	MARGOLIN, STEUBER E POPLACK, 2005
Febre	58	60	55	61
Palidez	45	-	54,3	-
Dor óssea	39	-	30,3	23
Astenia	38,3	50	-	-
Emagrecimento	18	26	-	-

No exame físico ao diagnóstico, a palidez (81%) foi o achado mais freqüente entre os pacientes deste estudo, seguido de hepatomegalia (78%), esplenomegalia (63%) e linfonodomegalia (52%), o que está de acordo com outros trabalhos realizados. Estudo publicado em 2004, por Medrone et al., realizado em São Paulo, encontrou hepatomegalia em 50% dos pacientes, esplenomegalia em 50% e linfonodomegalia em 22%. Margolin, Steuber e Poplack (2005) relataram hepatomegalia em 68% dos casos, esplenomegalia em 63% e linfonodomegalia em 50% (Tabela 25).

TABELA 25. COMPARAÇÃO ENTRE AS FREQUÊNCIAS DOS ACHADOS NO EXAME FÍSICO INICIAL (%)

ACHADO NO EXAME FÍSICO	LICHTVAN, 2007	MEDRONE ET AL., 2004	MARGOLIN, STEUBER E POPLACK, 2005
Hepatomegalia	78	50	68
Esplenomegalia	63	50	63
Linfonodomegalia	52	22	50

Considerando os valores de hemoglobina encontrados no hemograma ao diagnóstico, 79% dos pacientes apresentavam hemoglobina abaixo de 10 g/dl, sendo 38% abaixo de 7 g/dl. Estudo de Ma et al., publicado em 1997, evidenciou

que 40% dos casos apresentava valor de hemoglobina abaixo de 7 g/dl. Em relato de Margolin, Steuber e Poplack, esta proporção foi de 43%, sendo que 80% dos pacientes apresentava hemoglobina menor que 10 g/dl.

Margolin, Steuber e Poplack evidenciaram que contagem de leucócitos acima de 10.000/ μ l ocorria em aproximadamente 50% das crianças com LLA e, em 20%, este valor estava acima de 50.000/ μ l. Contagem de leucócitos acima de 50.000/ μ l também foi relatada em 20% dos pacientes analisados por Ma et al., em 1997. Dos 1.612 pacientes analisados por Chessels et al., em 1997, na Inglaterra, 21% apresentavam mais de 50.000/ μ l. No presente estudo, 57% dos pacientes apresentaram contagem de leucócitos acima de 10.000/ μ l e 26% acima de 50.000/ μ l. Os pacientes que apresentavam contagem de leucócitos maior que 50.000/ μ l apresentaram pior prognóstico, com sobrevida em cinco anos de 45%, valor estatisticamente significativo. Este achado está de acordo com a literatura, que evidencia pior prognóstico para estes pacientes (Smith et al., 1996).

Em 73% dos pacientes avaliados, a contagem de plaquetas encontrava-se abaixo de 100.000/ μ l. Estudo realizado por Ma et al., em 1997, encontrou 75% dos casos com contagem de plaquetas abaixo de 100.000/ μ l, assim como Margolin, Steuber e Poplack (2005).

Em 3,8% dos pacientes estudados foi diagnosticado envolvimento inicial de SNC, o que também está de acordo com a literatura, que demonstra ser raro, ocorrendo em menos de 5% dos casos (BLEYER, 1988).

Em relação à imunofenotipagem, 93% dos pacientes apresentavam LLA de linhagem B e 7%, LLA de linhagem T. Entre as LLA de linhagem B, a maioria dos casos (73%) foi classificada como pré-B precoce. Rego et al., em 1996, em Ribeirão Preto, avaliaram 153 crianças, sendo 82% LLA de linhagem B; Dworzak et al., em 2003, na Áustria, encontraram LLA de linhagem B em 87% dos casos e Udayakumar et al., em 2007, 83%. A menor porcentagem de LLA de linhagem T pode estar associada a menor proporção de pacientes adolescentes nesta amostra, na qual

apenas 18% de casos estavam acima de 10 anos. Estudo publicado em 1997, por Chessells et al., 1612 crianças apresentavam idade entre zero e 14 anos com LLA; destas 8,5% apresentavam LLA T e 8% não foram classificáveis, resultados semelhantes ao observado neste estudo. Segundo Behm e Campana, EUA, em publicação de 2000, a porcentagem de LLA pré-B precoce varia de 60% a 65%, LLA pré-B, de 20% a 25%, B transicional de 1%, B madura de 2% a 4% e LLA de linhagem T, de 15% a 18% (Tabela 26).

TABELA 26. FREQUÊNCIA DOS SUB-TIPOS DE LLA, EM DIFERENTES CASUÍSTICAS

TIPO DE LLA	LICHTVAN, 2007	REGO ET AL., 1996	DWORZAK ET AL., 2003	UDAYAKUMAR ET AL., 2007
Pré-B precoce	73	*	63	43
Pré-B	7,5	*	20	40
B transicional	1,5	-	2	-
B	3	2,6	2	-
T	7	16,4	13	15
Não classificável	8	0,6	-	2

Nota: * Neste estudo foram utilizados outros critérios de subclassificação da LLA de linhagem B, sendo que pré-B e pré-B precoce foram agrupadas como LLA B precursora, representando 79% dos casos.

Pui et al., em 1993, publicaram que entre 40% e 45% das LLA de linhagem T expressam CD10. Estudo realizado por Udayakumar et al., em 2007, evidenciou expressão de CD10 em 30% dos pacientes com LLA de linhagem T. Nesta pesquisa, 44% dos casos com LLA T expressaram CD10.

Considerando a presença de CD10 nas LLA de linhagem B, observa-se diferentes frequências na expressão desse antígeno. Petkovic et al., em 1996, avaliaram 55 crianças e das 44 com LLA de linhagem B, 70,5% expressaram CD10. Também em 1996, Rego et al. analisaram 153 crianças com LLA e em 73% houve expressão de CD10. Dentre os 47 pacientes avaliados por Udayakumar et al., em 2007, 83% eram de linhagem B e 87% destes expressavam CD10. Behm e

Campana (2000) relataram que CD10 ocorre em 95% nas LLA pré-B precoces, 98% nas pré-B e 50% nas B transicionais e nas B maduras. Nesta casuística, 91% dos pacientes expressaram CD10. Esta porcentagem pode ser explicada porque 80,5% dos pacientes com LLA de linhagem B são pré-B precoce ou pré-B, os subtipos que apresentam mais expressão de CD10.

Em relação às anormalidades cromossômicas, 19% dos pacientes apresentaram resultado da citogenética convencional normal, 19% hiperdiploidia entre 47 e 50 cromossomos, 16% entre 51 e 68 cromossomos, 43% pseudodiploidia e 9% hipodiploidia. Alterações numéricas e estruturais estavam presentes em 10,5% dos casos, somente alterações numéricas em 32% e somente alterações estruturais em 44%. Pérez-Vera et al., em 2001, avaliaram 131 pacientes e encontraram citogenética normal em 22% dos casos, alterações numéricas em 40%, alterações estruturais em 19% e ambas em 15% dos pacientes. A porcentagem de pseudodiploidia encontrada neste estudo assemelha-se a de dois estudos realizados por Pui et al., em 1990, 41,5%, e em 1995, 42%. Em relação a hiperdiploidia entre 51 e 68 cromossomos, a porcentagem encontrada neste trabalho foi semelhante a dos estudos de Dastungue et al., de 1992, com 16,3% e a de Tien et al., também de 1992, com 15,9%. Resultados de outros estudos estão descritos na tabela 27.

Entre as trissomias, a mais freqüente foi a do cromossomo 21 (42%), seguida dos cromossomos 22 (26%), 4 (24%), 8 (24%) e 6 (21%). No estudo realizado em 2000, por Nordgren et al., na Suécia, a trissomia mais comum foi a do cromossomo 21, concordante com a base de dados de Mitelman et al., em 2006, onde a freqüência de trissomia do cromossomo 21 encontrada foi de 20%. Pérez-Vera et al., no estudo realizado em 2001, relataram que nos pacientes avaliados, os cromossomos mais envolvidos nas hiperdiploidias foram os 4, 6, 18 e 21.

TABELA 27. COMPARAÇÃO ENTRE FREQUÊNCIA DAS PLOIDIAS NAS CRIANÇAS COM LLA (%)

AUTOR/ANO	NORMAL	HIPODIPL.	PSEUDODIPL.	HIPERDIPL.	HIPERDIPL.
				47-50 CROM	51-68 CROM
Lichtvan, 2007	19	9	43	19	16
Pui et al., 1990	8	8	41,5	15,5	27
Rivera et al., 1991	9	7	38	13	28
Petkovic et al., 1996	36	6	26	11	20
Pérez-Vera et al., 2001	22	9	20	7	20
Harrison, 2001	18	8	29	12	32
Nordgren et al., 2002	17	3	34	10	26
Prado Jr et al., 2006	39	14	*	*	*
Udayakumar et al., 2007	44	4,5	22	11	19

Hipodipl. = hipodiploidia

Hiperdipl. = hiperdiploidia

* O estudo não divide a hiperdiploidia, referindo no total 37% dos pacientes com esta alteração. As alterações estruturais foram detectadas em 41% dos casos.

Raimondi et al., em 1996, analisaram 182 crianças com hiperdiploidia e as trissomias mais comuns foram as dos cromossomos 21 (97%), 6 (86%), X (81%), 14 (80%), 4 (76%), 18 e 17 (68% cada), 10 (56%) e 8 (34%). Udayakumar et al., em 2007, encontraram maior frequência de trissomia do cromossomo 21, seguida dos cromossomos 6, 4, 14, 22 e X.

A hiperdiploidia com mais de 50 cromossomos está relacionada a melhor prognóstico (SECKER-WALKER et al., 1989; PUI et al., 1989). Estudos realizados

por Harris et al., em 1992, e por Martin et al., em 1996, evidenciaram respostas ainda melhores ao tratamento nos pacientes com trissomias dos cromossomos 4 e 10. Neste estudo, a hiperdiploidia não interferiu de modo estatisticamente significativo no prognóstico. Dos 18 pacientes com hiperdiploidia com mais de 50 cromossomos, seis (33%) ainda estão em tratamento, nove pacientes (50%) estão fora de tratamento e em remissão, um (5,5%) apresentou recidiva da doença e está em tratamento, e dois pacientes (11%) não entraram em remissão e foram a óbito. Em relação às trissomias dos cromossomos 4 e 10, observou-se que: dois pacientes que estão fora de tratamento apresentam trissomias do cromossomos 4, um paciente fora de tratamento apresenta trissomia dos cromossomos 4 e 10; dos dois pacientes que foram a óbito, um apresentava trissomia do 4 e outro trissomia do 4 e do 10. A resposta ao tratamento dos pacientes com hiperdiploidia com mais de 50 cromossomos foi favorável, com 11% de óbito, porém as trissomias dos cromossomos 4 e 10 não estiveram associadas a melhor prognóstico neste estudo. Estes resultados não apresentaram significância estatística. Considerando todas as hiperdiploidias juntas, a sobrevida em cinco anos foi de 80%.

Comparações de estudos citogenéticos de base populacional da LLA de diferentes partes do mundo são necessárias para explicar diferenças nas alterações cromossômicas. Embora diferenças técnicas entre os laboratórios não possam ser excluídas como causas, ao menos para algumas das diferenças observadas, diferenças sistemáticas na exposição aos fatores oncogênicos ambientais ou de origem étnica e geográfica são hipóteses que podem ser consideradas.

A hiperdiploidia entre 47 e 50 cromossomos era considerada um fator de prognóstico intermediário (WILLIAMS et al., 1982; BLOOMFIELD et al., 1989), porém estudo realizado por Raimondi et al., em 1992, evidenciou sobrevida livre de eventos, em quatro anos, de 77%. Nesta casuística, 22 pacientes apresentavam hiperdiploidia entre 47 e 50 cromossomos; destes, sete (32%) estão em tratamento, oito (36%) estão fora de tratamento e em remissão, sete (32%) recidivaram e destes,

cinco (23%) foram a óbito. A resposta ao tratamento dos pacientes com hiperdiploidia entre 47 e 50 cromossomos foi pior do que para os pacientes com hiperdiploidia com mais de 50 cromossomos.

Considerando todas as hiperdiploidias juntas, a sobrevida, em cinco anos, foi de 80%.

A monossomia mais freqüente neste estudo foi a do cromossomo 22 (50%), seguida dos cromossomos 20 e 21 (40% cada). Pui et al., em 1987, encontraram maior freqüência da monossomia do cromossomo 20. No estudo realizado por Pérez-Vera et al., em 2001, os cromossomos envolvidos nas hipodiploidias foram 6, 17, 18 e 21.

Como a hipodiploidia é menos freqüente nas crianças com LLA, seu prognóstico ainda não está determinado. Raimondi, em 2000, relatou que 80% das hipodiploidias apresentavam 45 cromossomos. Neste estudo 10 pacientes apresentavam hipodiploidia, sendo que seis tinham 45 cromossomos. Cinco pacientes (50%) encontram-se em tratamento em remissão contínua completa, dois (20%) apresentaram duas recidivas e óbito, um (10%) apresentou recidiva e está em tratamento e um (10%) foi a óbito durante o tratamento inicial. A taxa de sobrevida, em quatro anos, neste estudo foi de 52%. Rivera et al., em 1991, evidenciaram sobrevida livre de eventos, em quatro anos, de 46% para pacientes com hipodiploidia.

Pacientes com citogenética normal apresentaram melhor prognóstico, com sobrevida em cinco anos de 90%. Uma hipótese para esta taxa de sobrevida alta pode ser a presença da t(12;21) nestes pacientes, que é uma translocação que confere melhor prognóstico e dificilmente pode ser detectada pela CC.

Em relação às alterações estruturais, as mais freqüentes foram as anormalidades no braço curto do cromossomo 12 (7%), seguidas de anormalidades no braço longo do cromossomo 6 (6%), t(4;11)(q21;q23) (6%), e t(1;19)(q23;p13) (4,5%). Segundo Raimondi et al., em 1986, e Van der Plas et al., em 1994, as

anormalidades em 12p ocorrem em 8% a 11% das crianças com LLA. Segundo Prigogina et al., em 1988, e Raimondi, em 1993, as anormalidades em 6q são encontradas em 4% a 13% dos pacientes. A incidência da t(4;11) varia de 1,6% a 11% (PRIGOGINA et al., 1979; MIRRO et al., 1986, PUI et al., 1991). A translocação mais comumente detectada pela CC é a t(1;19), ocorrendo em 5% a 6% (WILLIAMS et al., 1984; LAI et al., 1989; PUI et al., 1994).

A t(12;21) é encontrada em 25% dos casos de LLA infantil quando usados métodos de FISH e PCR, porém em menos de 0,05% dos pacientes consegue ser detectada por CC (ROMANA et al., 1995; SHURTLEFF et al., 1995). Neste estudo foi identificado um paciente com a t(12;21), correspondendo a 0,9% dos casos. A t(9;22) é encontrada em 3% a 5% dos pacientes pediátricos com LLA (RIBEIRO et al., 1987; CRIST et al., 1990), porém entre os pacientes desta amostra, apenas 1 (0,9%) apresentou esta translocação. Observa-se que as proporções das alterações estruturais variam consideravelmente entre vários estudos (Tabela 28).

TABELA 28. COMPARAÇÃO ENTRE AS PORCENTAGENS DE ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS NOS PACIENTES COM LLA

AUTOR/ANO	ANORM 12p	ANORM 6q	t(4;11)	t(1;19)	t(9;22)
Lichtvan, 2007	7	6	6	4,5	0,9
Petkovic et al., 1996	-	7,3	2	5,5	-
Perkins et al., 1997	6,5	6	2,5	1,5	2,5
Chessells et al., 1997	-	-	2,5	3	2,5
Forestier et al., 2000	4,6	4,3	2	1,3	2,2
Pérez-Vera et al., 2001	-	0,8	-	4	5
Harrison, 2001	-	7	1	3	2
Prado Jr et al., 2006	-	-	1	3	1
Udayakumar et al., 2007	-	-	2	-	6,4

Algumas características estão associadas à t(4;11), como contagem

elevada de leucócitos, esplenomegalia, hepatomegalia, envolvimento inicial de SNC, anemia, ausência de hiperdiploidia, idade menor ao diagnóstico, imunofenótipo pré-B precoce e prognóstico ruim (ARTHUR et al., 1982; NAGASAKA et al., 1983; KOCOVA et al., 1985; MIRRO et al., 1986; STARK et al., 1986; HAGEMEIJER et al., 1987; LAMPERT et al., 1987; PUI, 1992; SECKER-WALKER et al., 1998; ROWLEY et al., 1998). Dos sete pacientes com esta translocação, quatro apresentavam menos de 12 meses; cinco apresentavam hepatoesplenomegalia; dois, envolvimento de SNC ao diagnóstico; cinco apresentavam 46 cromossomos; todos eram LLA pré-B precoce. A contagem de leucócitos variou de 44.800/ μ l a 444.000/ μ l e a hemoglobina variou de 3,4 g/dl a 7,7 g/dl. Pacientes com t(4;11) apresentam pior prognóstico, com maior risco de óbito, com valores estatisticamente significativos. Dos sete pacientes, cinco foram a óbito, três deles após recidiva da doença, confirmando o prognóstico desfavorável da presença desta translocação. Dois pacientes encontram-se em tratamento (Tabela 29).

Algumas características associadas à t(9;22) são idade maior ao diagnóstico, contagem inicial de leucócitos elevada, porcentagem alta de blastos no sangue periférico e comprometimento de SNC ao diagnóstico (PRIEST et al., 1980; CRIST et al., 1990). O único paciente com esta translocação detectada ao diagnóstico apresentava cinco anos e oito meses, contagem de leucócitos de 31.700/ μ l, com 63% de blastos, sem envolvimento de SNC pela LLA. Foi a óbito três meses após o diagnóstico. Vários estudos evidenciam que esta translocação confere pior prognóstico (BLOOMFIELD et al., 1989; CRIST et al., 1990; FLETCHER et al., 1992).

TABELA 29. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM T(4;11)

PACIENTE	1	2	3	4	5	6	7
Idade (meses)	4	69	7	76	7	2	144
Leucócitos/ μ l	444.000	88.400	44.800	260.000	85.900	438.000	119.000
Hemoglobina g/dL	5,7	4,9	7,4	9,2	3,4	7,7	3,3
Plaquetas/ μ l	50.000	25.000	80.000	8.000	17.000	122.000	58.000
Esplenomegalia							
(cm abaixo da borda costal)	8	7	2	4	8	4	2
Hepatomegalia							
(cm abaixo da borda costal)	5	5	0	4	4	3	2
Envolvimento do SNC	sim	não	sim	não	não	não	não
Pré-B precoce	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Hiperdiploidia	não	sim	não	não	não	não	sim
Evolução	Óbito	Óbito	Óbito	Óbito	Em tto	Em tto	Óbito

O *Pediatric Oncology Group* (POG) encontrou relação entre pacientes com LLA pré-B e t(1;19) com risco maior de recidiva do que outras crianças com LLA pré-B (MELLENTIN et al., 1989). No entanto, alguns casos, em que foram utilizados protocolos terapêuticos mais agressivos, mostraram resultados de sobrevida comparáveis aos de pacientes sem esta translocação (sobrevida livre de eventos em 4 anos de 73% \pm 4%) (PUI et al., 1984; RAIMONDI et al., 1990; RIVERA et al., 1991; RUBIN et al., 1991; UCKUN et al., 1998). Dos cinco pacientes com esta translocação, dois encontram-se em tratamento, um está fora de tratamento e em remissão, e dois foram a óbito.

Na análise multivariada, além da $t(4;11)$, a ocorrência de recidiva mostrou-se como um fator de pior prognóstico, com valor estatisticamente significativo. Este achado está de acordo com a literatura, que relata pior prognóstico para pacientes com recidiva medular da doença, principalmente quando esta é precoce, ou seja, durante os primeiros dois anos de tratamento (SILVERMAN e SALLAN, 2003).

Conforme Green et al. (1998), as taxas de recidiva encontram-se em torno de 30%. Em relação aos pacientes incluídos nesta casuística, 31,5% apresentaram recidiva da doença. As taxas de óbito variam de 20% a 30% (PUI et al., 2000). Neste estudo, 27,8% das crianças com LLA foram a óbito. A taxa de sobrevida global, em cinco anos, foi de 73%, próximo do valor encontrado em estudos mais recentes, de 80% (SILVERMAN et al., 2001; PUI et al., 2004).

6 CONCLUSÕES

A análise de um grupo de crianças com LLA permitiu identificar as seguintes variáveis clínicas e laboratoriais:

1. Os sinais e sintomas mais freqüentes foram febre (58%), palidez (45%), dor nos MMII (39%) e astenia (38%) seguidos de inapetência (26%), aparecimento de equimoses (22%), dor abdominal (22%), perda de peso (18%), sangramento (14%), tosse (11%) e linfonodomegalia (9%). Esses dados estão de acordo com a literatura.

2. Em relação ao hemograma, ao diagnóstico, a maioria dos pacientes apresentava hemoglobina abaixo de 10 g/dl (79%), contagem de leucócitos superior a 10.000/ μ l (57%) e contagem de plaquetas abaixo de 100.000/ μ l (73%), concordando com relatos da literatura mundial.

3. Conforme o imunofenótipo, as LLAs foram classificadas em LLA pré-B precoce, pré-B, B transicional, B madura e LLA T. A maioria dos pacientes (93%) apresentava LLA de linhagem B, sendo 73% LLA pré-B precoce. Em 91% das LLA de linhagem B e em 44% das de linhagem T houve expressão de CD10.

4. Entre as alterações cromossômicas numéricas, a mais comum foi a pseudodiploidia, presente em 43% dos pacientes. Em relação às aberrações cromossômicas estruturais, as mais freqüentes foram a t(4;11)(q21;q23), presente em 6% dos pacientes; t(1;19)(q23;p13), em 4,5%; e anormalidades em 6q, em 6% dos casos. Assim como relatado na literatura, os pacientes com t(4;11) apresentaram pior prognóstico.

5. Foram evidenciados como fatores de pior prognóstico: a ocorrência de recidivas, a presença da $t(4;11)(q21;q23)$, além de idade menor que um ano; e contagem inicial de leucócitos maior que 50.000/ μ l; o que está de acordo com a literatura.

REFERÊNCIAS

- ABE, R; SANDBERG, A.A. Significance of abnormalities involving chromosomal segment 11q22-25 in acute leukemia. **Cancer Genet Cytogenet**, v.13, p.121-127, 1984.
- ALEXANDER, F.E. et al. Transplacental chemical exposure and risk of infant leukaemia with MLL gene fusion. **Cancer Res**, v. 61, p. 2542-2546, 2001.
- AN INTERNATIONAL SYSTEM FOR HUMAN CYTOGENETIC NOMENCLATURE. **Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature**. Farmington, USA, 2005.
- ANDREWS, R. G.; SINGER, J. W.; BERNSTEIN I. D. Precursors of colony-forming cells in humans can be distinguished from colony-forming cells by expression of the CD33 and CD34 antigens and light scatter properties. **J Exp Med**, v. 169, p. 1721-1731, 1989.
- ARICO, M. et al. Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**, v. 342, p. 998–1006, 2000.
- ARTHUR, D.C. et al. Translocation 4;11 in acute lymphoblastic leukemia: Clinical characteristics and prognostic significance. **Blood**, v. 59, p. 96-99, 1982.
- BAIN, B.J. **Diagnóstico em leucemias**. Rio de Janeiro, Revinter, 2003, p.47-97.
- BEGLEY, C. G.; GREEN, A. R. The SCL gene: from case report to critical hematopoietic regulator. **Blood**, v.93, p. 2760-2770.
- BEHM, F. G. *Malignancies of the bone marrow*. In: **Pediatric Neoplasia: Morphology an Biology**. Philadelphia: David M. Parham Lippincott – Raven Publisher, 1996. 15, pp. 449-504.
- BEHM, F. G. Rearrangement of the MLL gene confers a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia, regardless of presenting age. **Blood**, v. 87, p. 2870-2877, 1996.
- BEHM, F. G., CAMPANA, D. Immunophenotyping. In: PUI, C. H. **Childhood Leukemias**. Cambridge. 2000, p. 111-144.
- BEHM, F. G. et al. Lack of CD45 antigen on blast cells childhood acute lymphoblastic leukemia is associated with chromosomal hyperdiploidy and other favorable prognostic features. **Blood**, v. 79, p. 1011-16, 1992.
- BEHM, F. G.. et al. B-precursor ALL with unexpected expression of surface immunoglobulin (slg) mu and lambda. **Mod Pathol**, v. 8, p. 106, 1995.

BELKOV, V. M. et al. Reduced folate carrier expression in acute lymphoblastic leukemia: a mechanism for ploidy but not lineage differences in methotrexate accumulation. **Blood**, v. 93, p. 1643-1650, 1999.

BEN-SASSON, S. A.; DAVIS, D. L. Neonatal exposure to protoporphyrin-activating lighting as a contributing cause of childhood acute lymphocytic leukemia. **Cancer Causes Control**, v. 3, p. 383-387, 1992.

BENNETT, J.M. et al. Proposals for the classification of the acute leukemias (FAB cooperative group). **Br J Haematol**, v. 33, p. 451-458, 1976.

BERGER, R. et al. Cytogenetic studies of 44 T-cell acute lymphoblastic leukemias. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 44, p. 69-75, 1990.

BIONDI, B. et al. Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. **Blood**, v. 96, p. 24-33, 2000.

BLEYER, W. A. Central nervous system leukemia. **Pediatr Clin North Am**, v. 35, p. 789-814, 1988.

BLOOMFIELD, C. D.; TRENT, J. M.; VAN DER BERGHE, H. Report of the committee on structural chromosome changes in neoplasia. **Cytogenet Cell Genet**, v. 51, p. 344-366, 1987.

BLOOMFIELD, C. D. et al. Six-year follow-up of the clinical significance of karyotype in acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 40, p. 171, 1989.

BOEHM, T. The rhombotin family of cysteine-rich LIM-domain oncogenes: Distinct members are involved in T-cell translocations to human chromosomes 11p15 and 11p13. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 88, p. 4367-4371, 1991.

BOEHM, T. et al. A cluster of chromosome 11p13 translocations found via distinct DD and D-D-J rearrangements of the human T cell receptor 6 chain gene. **EMBO**, v. 7, p. 2011-2017, 1988.

BOROWITZ, M. J. et al. Prognostic significance of CD34 expression in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. **J Clin Oncol**, v. 8, p. 1389-1398, 1990.

BOROWITZ, M. J et al. Myeloid-antigen expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**, v. 325, p. 1379, 1991.

BOROWITZ, M. J et al. Predictability of the t(1;19)(q23;p13) from surface antigen phenotype: implications for screening cases of childhood acute lymphoblastic leukemia for molecular analysis: a Pediatric Oncology Group study. **Blood**, v. 82, p. 1086-91, 1993.

BOROWITZ, M. J et al. Prognostic significance of fluorescence intensity of surface marker expression in childhood B-precursor ALL. A Pediatric Oncology Group study. **Blood**, v. 89, p. 3960-3966, 1997.

BRADSTOCK, K. F. et al. Unusual immunophenotypes in acute leukaemias: Incidence and clinical correlations. **Br J Haematol**, v. 72, p. 512-518, 1989.

BURGER, B. et al. Diagnostic cerebrospinal fluid examination in children with acute lymphoblastic leukemia: significance of low leukocyte counts with blasts or traumatic lumbar puncture. **J Clin Oncol**, v. 21, p. 184-188, 2003.

CAMPBELL, M. et al. Discordant clinical presentation and outcome in infant twins sharing a common clonal leukemia. **Br J Haematol**, v. 93, p. 166-169, 1996.

CANTU-RAJNOLDI . A. et al. Co-expression of myeloid antigens in childhood acute lymphoblastic leukaemia: Relationship with the stage of differentiation and clinical significance. **Br J Haematol**, v. 79, p. 40-43, 1991.

CARROLL, A. J. et al. Pre-B cell leukemia associated with chromosome translocation 1;19. **Blood**, v. 63, p. 721-724, 1984.

CARROLL, A. J et al. The t(1;14)(p34;q11) is non-random and restricted to T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 76, p. 1220-1224, 1990.

CARROLL, A. J CASTLEBERRY, R. P.; CRIST, W. M. Lack of association between abnormalities of the chromosome 9 short arm and either "lymphomatous" features of T cell phenotype in childhood acute lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 69, p.735-738, 1987.

CHARRIN, C. et al. A report from the LALA-94 and LALA SA groups on hypodiploidy with 30 to 39 chromosomes and near-triploidy: 2 possible expressions of a sole entity conferring poor prognosis in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). **Blood**, v. 104, p. 2444-2451, 2004.

CHESSELLS, J.M. BAILEY, C. RICHARDS, S.M. Intensification of treatment and survival in all children with lymphoblastic leukaemia: results of UK Medical Research Council trial UKALL X. Medical Research Council Working Party on Childhood Leukaemia. **Lancet**, v.21, p. 143–48, 1995.

CHESSELLS, J.M. et al. Acute lymphoblastic leukemia in infancy: experience in MCR UKALL trials. Report from the Medical Research Council Working Party on Childhood Leukaemia. **Leukemia**, v. 8, p.1275-1279, 1994.

CHESSELLS, J.M. et al. Gender and treatment outcome in childhood lymphoblastic leukaemia: Report from the MRC UKALL trials. **Br J Haematol**, v. 89, p. 364-372, 1995.

CHESSELLS, J.M. Recent advances in management of acute leukemia. **Arch Dis Childhood**, v. 82, p. 438-442, 2000.

CHILDS, C.C. et al. Lineage heterogeneity in acute leukemia with the t(4;11) abnormality: Implications of acute mixed lineage leukemia. **Hematol Pathol**, v. 2, p. 145-157, 1988.

Cytogenetic/clinical entities. Disponível em <http://AtlasGeneticsOncology.org> , Acesso em 20/08/2007

CIMINO, G. et al. Cloning of ALL-1, the locus involved in leukemias with the t(4;11)(q21;q23), t(9;11)(p22;q23) and t(11;19)(q23;p13) chromosome translocations. **Cancer Res**, v. 51, p. 6712-6714, 1991.

CLARK, S. S. et al. Unique forms of the *abl* tyrosine kinase distinguish Ph1-positive CML from Ph1-positive ALL. **Science**, v. 235, p. 85-88, 1987.

CLARK, S. S.; CRIST, W. M.; WITTE, O.N. Molecular pathogenesis of Ph-positive leukemias. **Annu Rev Med**, v. 40, p. 113-122, 1989.

CNATTINGIUS, S. et al. Prenatal and neonatal risk factors for childhood lymphatic leukemia. **J Natl Cancer Inst**, v. 87, p. 908-914, 1995.

CONSOLINI, R. et al. Clinical relevance of CD10 expression in childhood ALL. The Italian Association for Pediatric Hematology and Oncology (AIEOP). **Haematologica**, v. 83, p. 967-973, 1998 (abstract).

CONTER, V. et al. Role of cranial radiotherapy for childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia with high WBC count and good response to prednisone. **J Clin Oncol**, v.15, p. 2786-2791, 1997.

CORTES, J. et al. The value of high-dose systemic chemotherapy and intrathecal therapy for central nervous system prophylaxis in different risk groups of adult acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 86, p.2091-2097, 1995.

COUSTAN-SMITH, E. et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 96, p. 2691-2696, 2000.

CRIST, W. et al. Acute lymphoid leukemia in adolescents: clinical and biologic features predict a poor prognosis – A Pediatric Oncology study. **J Clin Oncol**, v. 6, p. 34-43, 1988.

CRIST, W. et al. Philadelphia chromosome positive childhood acute lymphoblastic leukemia: clinical and cytogenetic characteristics and treatment outcome. A Pediatric Oncology Group study. **Blood**, v. 76, p. 489-494, 1990.

CRIST, W. et al. Poor prognosis of children with pre-B acute lymphoblastic leukemia is associated with the t(1;19)(q23;p13). A Pediatric Oncology Group Study. **Blood**, v. 76, p. 117-122, 1990.

CRISTÓFANI, L. M.; ZANICHELLI, M. A. Leucemias in MARCONDES, E. et al. **Pediatria Básica: Pediatria Clínica Geral**. São Paulo. Sarvier. Vol.II , 2003.

CROCE, C. M. Gene for alpha-chain of human T-cell receptor: Location of chromosome 14 region involved in T cell neoplasms. **Science**, v. 227, p. 1044-1047, 1985.

CUTHBERT, G.; THOMPSON, K.; McCULLOUGH, S. MLL amplification in acute leukaemia: a United Kingdom Cancer Cytogenetics Study Group (UKCCG) study. **Leukemia**, v.14, p. 1885-1891, 2000.

DELIA, D. et al. Detection of the common acute lymphoblastic leukaemia antigen (CALLA) on B cells from human fetal tissues. A multiple phenotypic characterization. **Clin Exp Immunol**, v. 59, p. 305-314, 1985.

DEL VECCHIO, L. et al. B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) heterogeneity. **Br J Haematol**, v. 72, p. 291-300, 1989.

DIAZ, M. O. et al. Deletions of interferon genes in acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**, v. 322, p. 77-82, 1990.

DJABALI, M. et al. A trithorax-like gene is interrupted by chromosome 11q23 translocations in acute leukaemias. **Nature Genetics**, v. 2, p. 113-118, 1992.

DOCKERTY, J. D. et al. Case-control study of parental age, parity and socioeconomic level in relation to childhood cancers. **Intern J Epidemiol**, v. 30, p. 1428-1437, 2001.

DONADIEU, J.; HILL, C. Early response to chemotherapy as a prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a methodological review. **Br J Haematol**, v. 115, p. 34-45, 2001.

DU MANOIR, S. et al. Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. **Human Genet**, v. 90, p. 590-610, 1993.

DUBÉ, I. D. et al. A new translocation, t(10;14)(q24;q11), in T-cell neoplasia. **Blood**, v. 67, p. 1181-1184, 1986.

DUKER, N.J. Chromosome breakage syndromes and cancer. **Am J Med Genet**, v.115, p.125-129, 2002.

DWORZAK, M. N., PANZER-GRÜMAYER, E. R. Flow cytometric detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Lymphoma**, v. 44, p. 1445-1455, 2003.

ERIKSON, J. et al. Deregulation of c-myc by translocation of the alpha-locus in T-cell leukemia. **Science**, v. 232, p. 884-886, 1986.

EVANS, W. E. Pharmacogenetics of thiopurine S-methyltransferase and thiopurine therapy. **Ther Drug Monit**, V. 26, P. 186-191, 2004

FASCHING, K. et al. Presence of clone-specific antigen receptor gene rearrangements at birth indicates an in utero origin of diverse types of early childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 95, p. 2722-2724, 2000.

FINA, L. et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. **Blood**, v. 75, p. 2417-2428, 1990.

FINK, F. M. et al. Prognostic significance of myeloid-associated antigen expression on blast cells in children with acute lymphoblastic leukemia. The Austrian Pediatric Oncology Group. **Med Pediatr Oncol**, v. 21, p. 340-346, 1993.

FLETCHER, J. A. et al. Extremely poor prognosis of pediatric acute lymphoblastic leukemia with translocation (9;22): updated experience. **Leuk Lymphoma**, v.8, p. 75-79, 1992.

FLETCHER, J. A. et al. Translocation (9;22) is associated with extremely poor prognosis in intensively treated children with acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 77, p. 435-439, 1991.

FLETCHER, J. A. et al. Prognostic implications of cytogenetic studies in an intensively treated group of children with acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 74, p. 2130-2135, 1989.

FORD, A. M. et al. In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukemias. **Nature**, v. 363, p. 358-360, 1993.

FORD, A. M. et al. Monoclonal origin of concordant T-cell malignancy in identical twins. **Blood**, v. 89, p. 281-285, 1997.

FORD, A. M. et al. Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, p. 4584-4588, 1998.

FORESTIER, E. et al. Cytogenetic findings in a population-based series of 787 childhood acute lymphoblastic leukemias from the Nordic countries. **Eur J Haematol**, v. 64, p. 194-200, 2000.

FORMAN, S.J. et al. Bone marrow transplantation for patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 70, p. 587-588, 1987.

GAJJAR, A. et al. Traumatic lumbar puncture at diagnosis adversely affects outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 96, p. 3381-3384, 2000.

GALE, K. B. et al. Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 94, p. 13950-13954, 1997.

GILL SUPER, H. J. et al. Clonal, nonconstitutional rearrangements of the MLL gene in infant twins with acute lymphoblastic leukemia: in utero chromosome rearrangement of 11q23. **Blood**, v. 83, p. 641-644, 1994.

GOLUB, T.R. et al. Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 92, p. 4917-4921, 1995.

GREAVES, M. F. Aetiology of acute leukaemia. **Lancet**, v. 349, p. 344-349, 1997.

GREAVES, M. F.. Molecular genetic, natural history and the demise of childhood leukaemia. **Eur J Cancer**, v. 35, p. 1941-1953, 1999.

GREAVES, M. F; PEGRAM, S.M; CHAN, L.C. Collaborative group study of the epidemiology of acute lymphoblastic subtypes: background and first report. **Leukemia**, v. 9, p. 715-733, 1985.

GREAVES, M. F. et al. A natural history for pediatric acute leukemia. **Blood**, v. 82, p. 1043-1051, 1993.

GREAVES, M.F. et al. Leukemia in twins: lessons in natural history. **Blood**, v. 102, p. 2321-2333, 2003.

GUSTAFSSON, G. et al. Improving outcome through two decades in childhood ALL in the Nordic countries: the impact of high-dose methotrexate in the reduction of CNS irradiation. Nordic Society of Pediatric Haematology and Oncology (NOPHO). **Leukemia**, v. 14, p. 2267-2275, 2000.

HAGEMEIJER, A. et al. Characterization of the blast cells in acute leukemia with translocation (4;11): report of eight additional cases and of one case with a variant translocation. **Leukemia**, v. 1, p. 24-31, 1987.

HALTRICH, I. et al. Multipoint interphase FISH in childhood T-acute lymphoblastic leukemia detects subpopulation that carry different chromosome 3 aberrations. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 172, p. 54-60, 2007.

HANN, I. et al. Determinants of outcome after intensified therapy of childhood lymphoblastic leukaemia: results from Medical Research Council United Kingdom acute lymphoblastic leukaemia XI protocol. **Br J Haematol**, v. 113, p. 103-114, 2001.

HARBOTT J. et al. Incidence of TEL/AML1 fusion gene analysed consecutively in children with acute lymphoblastic leukemia in relapse. **Blood**, v. 90, p. 4933-4937, 1997.

HARRIS, M. B. et al. Trisomy of leukemic cell chromosomes 4 and 10 identifies children with B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia with a very low risk of treatment failure: a Pediatric Oncology Group study. **Blood**, v. 79, p. 3316-3324, 1992

HARRISON, C. J. The detection and significance of chromosomal abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Blood Reviews**, v. 15, p. 49-58, 2001.

HATANO, M. et al. Deregulation of a homeobox gene, HOX11, by the t(10;14) in Tcell leukemia. **Science**, v. 253, p. 79-82, 1991.

HAYASHI, Y. et al. Abnormalities of the long arm of chromosome 6 in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 76, p.1626-1630, 1990.

HEEREMA, N. A. et al. Hypodiploidy with less than 45 chromosomes confers adverse risk in childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. **Blood**, v. 94, 4036–4045, 1999.

HEEREMA, N. A. et al. Secondary cytogenetic aberrations in childhood Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia are nonrandom and may be associated with outcome. **Leukemia**, v. 18, p. 693-702, 2004.

HEEREMA, N. A.; ARTHUR, D. C.; SATHER, H. Cytogenetic features of infants less than 12 months of age at diagnosis of acute lymphoblastic leukemia: impact of the 11q23 breakpoint on outcome: a report of the Children's Cancer Group. **Blood**, v. 83, p. 2274-2284, 1994.

HEEREMA, N. A.; SATHER, H. N.; SENSEL, M. G. Clinical significance of deletions of chromosome arm 6q in childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. **Leuk Lymphoma**, v. 36, p. 467-478, 2000.

HEIM, S.; MITELMAN, F. **Cancer Cytogenetics**. 2 ed. New York, Alan R. Liss, 1995.

HEISTERKAMP, N. et al. The bcr gene in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 73, p. 1307-1311, 1989.

HEMMINKI, K.; KYIRONEN P.; VAITTINEN P. Parental age as a risk factor of childhood leukemia and brain cancer in offspring. **Epidemiology**, v. 10, p. 371-375, 1999.

HERMANS, A. et al. Unique fusion of BCR and c-ABL genes in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia. **Cell**, v. 51, p.33-40, 1987.

HOELZER, D.; LUDWIG, W.; ECKHARD, E. Improved outcome in adult B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 87, p. 495-508, 1996.

HÜSCH, M. I. **Classificação Imunofenotípica das Leucemias Linfóides Agudas na Infância**, p. 1-12, 1989. Dissertação de Mestrado em Pediatria. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

INFANTE-RIVARD, C.; SINNET, D. Preconceptional paternal exposure to pesticides and increased risk of childhood leukaemia. **Lancet**, v. 354, p. 1819, 1999.

INFANTE-RIVARD, C. et al. Risk of childhood leukemia associated with exposure to pesticides and with gene polymorphisms. **Epidemiology**, v. 10, p. 481–487, 1999.

ITO, C. et al. Hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia with 51 a 56 chromosomes: a distinct biological entity with a marked propensity to undergo apoptosis. **Blood**, v. 93, p. 315-320, 1999.

JACKSON, T. et al. Deletion of 6q16-q21 in human lymphoid malignancies: a mapping and deletion analysis. **Cancer Research**, v.60, p.2775-2779, 2000.

JAMUR, V. R. **Estudo citogenético de pacientes com LMC tratados com mesilato de imatinibe**, 2005. Dissertação de Mestrado em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

JEHA, S. et al. Prognostic significance of CD20 expression in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 108, p. 3302-3304, 2006.

JONATHAN, A. et al. Translocation (9;22) is associated with extremely poor prognosis in intensively treated children with acute lymphoblastic leukemia, **Blood**, v. 77, p. 435-439, 1991.

JUSTEMENT, L. B. et al. Regulation of B cell antigen receptor signal transduction and phosphorylation by CD45. **Science**, v. 252, p. 1839-1842, 1991.

JUSTEMENT, L. B.; BROWN, V. K. ; LIN, J. Regulation of B-cell activation by CD45: a question of mechanism. **Immunol Today**, v. 15, p. 399-406, 1994.

KAGAN, J. et al. Detection of minimal residual disease in leukemic patients with the t(10;14)(q24;q11) chromosomal translocation. **Cancer Res**, v. 50, p. 5240-5244, 1990.

KAI, T. et al. Clinical and prognosis implications of bone lesions in childhood leukemia at diagnosis. **Leuk Lymphoma**, v.23, p.119-123, 1996.

KAMIHIRA, S. Flow cytometry detection of minimal DNA aneuploidy: comparison with metaphase and interphase cytogenetics. **Int J Oncol**, v. 5, p.211-214, 1994.

KANEKO, Y. Chromosome translocations involving band 7q35 or 7p15 in childhood T-cell leukemia/lymphoma. **Blood**, v. 72, p. 534-538, 1988.

KARHU, R. et al. Genetic aberrations in pediatric acute lymphoblastic leukemia by comparative genomic hybridization. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 95, p. 123-129, 1997.

KASPERS, G. J. L. et al. Favorable prognosis of hyperdiploid common acute lymphoblastic leukemia may be explained by sensitivity to antimetabolites and other drugs: results of an in vitro study. **Blood**, v. 85, p. 751-756, 1995

KATO, T. et al. Mechanism of T cell contact-dependent B cell activation. **J Immunol**, v. 152, p. 2130-2138, 1994.

KATZ, F. et al. Cellular and molecular studies on infant null acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 71, p. 1438-1447, 1988.

KAY, H.E. Testicular infiltration in acute lymphoblastic leukaemia. **Br J Haematol**, v. 53, p. 537-542, 1983.

KAYE, S. A. et al. Maternal reproductive history and birth characteristics in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, v. 68, p. 1351-1355, 1991.

KERSEY, J.H. Fifty years of studies of the biology and therapy of childhood leukemia. **Blood**, v. 90, p. 4243-4251, 1997.

KIKUCHI, M. et al. Bone marrow aplasia with prominent atypical plasmacytic proliferation preceding acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Lymphoma**, v. 35, p. 213-217, 1999.

KIRCHHOFF, M. et al. Deletions below 10 megabasepairs are detected in comparative genomic hybridization by standard reference intervals. **Genes Chromosomes Cancer**, v.4, p. 410-413, 1999.

KLAUS, S. J.; SIDORENKO, S. P.; CLARK, E. A. CD45 ligation induces cell death in T and B lymphocytes. **J Immunol**, v. 156, p. 2743-2753, 1996.

KOCOVA, M; KOWALCZYK, J. R.; SANDBERG, A. Translocation 4;11 acute leukemia: three case reports and review of the literature. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 16, p. 21-32, 1985.

KONOPKA J.B. et al. Cell lines and clinical isolates derived from Ph1-positive chronic myelogenous leukemia patients express c-abl proteins with a common structural alteration. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 82, p. 1810-1814, 1985.

KOWALCZYK, J. A possible subgroup of ALL with 9p-. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 9, p. 383-385, 1983.

KRAJINOVIC. M.; COSTEA, I.; CHIASSON, S. Polymorphism of the thymidylate synthase gene and outcome of acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, v. 359, p.1033-1034, 2002.

KRISTENSEN, T. et al. High-resolution comparative genomic hybridisation yields a high detection rate of chromosomal aberrations in childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Europ J Haematol**, v. 70, p. 363-372, 2003.

KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. **Mol Aspects Med**, v.27, p. 95-125, 2006.

KUREC, A. S. et al. Significance of aberrant immunophenotypes in childhood acute lymphoid leukemia. **Cancer**, v. 67, p. 3081-3086, 1991.

LAI, J. L. Translocation t(1;19)(q23:p13) in acute lymphoblastic leukemia: A report on six new cases and an unusual t(17;19)(q11;q13), with special reference to prognostic factors. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 37, p. 9-17, 1989.

LAMPERT, F. et al. Karyotypes in acute childhood leukemias may lose prognostic significance with more intensive and specific chemotherapy. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 54, p. 277-279, 1991.

LANGE, B. J. et al. Pediatric leukemia/lymphoma with t(8;14)(q24;q11). **Leukemia**, v. 6, p. 613-618, 1992.

LIANG, D.C. et al. High incidence of TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t (12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia in Taiwan. **Leukemia**, v. 10, p. 991-993, 1996.

LO COCO, F. et al. Acute lymphoblastic leukemia with the 4;11 translocation exhibiting early T-cell features. **Leukemia**, v.3, p.79-82, 1989.

LOOK, A.T. Aneuploidy and percentage of S-phase cells determined by flow cytometry correlate with cell phenotype in childhood acute leukemia. **Blood**, v. 60, p. 959-967, 1982.

_____. Genes altered by chromosomal translocations in leukemias and lymphomas. **The genetic basis of human disease**, Mc-Graw-Hill, New York, p. 109-141, 1998.

LOH, M.L. et al. Prospective analysis of *TEL/AML1*-positive patients treated on Dana-Farber Cancer Institute Consortium Protocol 95-01. **Blood**, v.107, p. 4508-4513, 2006.

LOPES, L.F., MENDES. W. Leucemias. In CAMARGO, B. LOPES, L.F. **Pediatria Oncológica: Noções Fundamentais para o Pediatra**. São Paulo, Lemar, 2000.

LUDWIG, W. D. et al. Incidence and prognostic significance of immunophenotypic subgroups in childhood acute lymphoblastic leukemia: Experience of the BFM study 86. **Recent Results Cancer Res**, v. 131, p. 269-282, 1993.

LUDWIG, W. D. et al. Incidence, clinical markers and prognostic significance of immunologic subtypes of acute lymphoblastic leukemia (ALL) in children: Experiences of the ALL-BFM 83 and 86 studies. **Klin Padiatr**, v. 202, p. 243-252, 1990.

LUDWIG, W. D.. et al. Phenotypic and genotypic heterogeneity in infant acute leukemia. I. Acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 3, p. 431-439, 1989.

LUGO, T. G. et al. Tyrosine kinase activity and transformation potency of *bcr-abl* oncogene products. **Science**, v. 247, p. 1079-1082, 1990.

MA, S.K. Clinical presentation, hematologic features and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Hematol Oncol**, v. 15, p. 141-49, 1997.

MAGALHÃES, I. Q. et al. TEL/AML1 fusion gene frequency in pediatric acute lymphoblastic leukemia in Brazil. **Br J Haematol**, v. 111, p. 204-207, 2000.

MAHMOUD, H et al. The nonrandom dic (9;12) translocation in acute lymphoblastic leukemia is associated with B-progenitor phenotype and an excellent prognosis. **Leukemia**, v. 6, p. 703-707, 1992.

MAHMOUD, H. et al. Intrauterine monoclonal origin of neonatal concordant acute lymphoblastic leukemia in monozygotic twins. **Med Pediatr Oncol**, v. 24, p. 77-81, 1995.

MARGOLIN, J. F.; STEUBER, C. P.; POPLACK, D. G. Acute Lymphoblastic Leukemia. In: PIZZO, P. A.; POPLACK, D. G. **Principles and practice of pediatric oncology**. Lippincott Williams and Wilkins, 2005, p. 539-590.

MARK, H. F. L. The detection of translocations using chromosome painting for monitoring exposure to potencial genotoxicants. **Med Health RI**, v. 79, p. 333-335, 1996.

MARK, H. F. L; JENKINS, R.; MILLER, W. Current applications of molecular cytogenetic technologies. **Ann Clin Lab Sci**, v. 27, p. 47-56, 1997.

MARTIN, P. L. et al. Comparison of fluorescence in situ hybridization, cytogenetic analysis, and DNA index analysis to detect chromosomes 4 and 10 aneuploidy in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. **J Pediatr Hematol Oncol**, v. 18, p. 113-121, 1996.

MATLOUB, Y.H. et al. Severe aplastic anemia preceding acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, v.71, p. 264-268, 1993.

MC LEAN, T. W. et al. TEL/AML-1 dimerizes and is associated with a favorable outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 88, p. 4242-4258, 1996.

MCGUIRE, E. A. et al. The t(11;14)(p15;q11) in a T-cell acute lymphoblastic leukemia cell line activates multiple transcripts, including Ttg-I, a gene encoding a potential zinc finger protein. **Mol Cell Biol**, v. 9, p. 2124-2132, 1989.

McNALLY, R.J. et al. Age and sex distributions of hematological malignancies in the U.K. **Hematol Oncol**, v. 15, p. 173-189, 1997.

MELKERSON-WATSON, L. J. et al. Elevation of lymphocyte CD45 protein tyrosine phosphatase activity during mitosis. **J Immunol**, v. 153, p. 2004-2013, 1994.

MELLENTIN, J.D. et al. The gene for enhancer binding proteins E12/E47 lies at the t(1;19) breakpoint in acute leukemia. **Science**, v. 246, p. 379-382, 1989.

MERUP, M.; MORENO, T. C.; HEYMAN, M. 6q deletions in acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphomas. **Blood**, v. 91, p. 3397-3400, 1998.

MICHIELS, J. J. et al. TdT positive B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) without Burkitt characteristics. **Br J Haematol**, v. 68, p. 423-426, 1988.

MIDDLETON, P. G. et al. Alpha interferon gene deletions in adults, children and infants with acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 5, p. 680-682, 1991.

MIGNON, L.L. et al. Prospective analysis TEL/AML1-positive patients treated on Dana-Faber Cancer institute Consortium Protocol 95-01. **Blood**, v. 107, p. 4508-4513, 2006.

MIRRO, J. et al. Clinical and laboratory characteristics of acute leukemia with the 4;11 translocation. **Blood**, v. 67, p. 689-697, 1986.

MITELMAN, F.; MERTENS, F.; JOHANSSON, B. A Breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. **Nat Genet**, v. 15, p. 417-73, 1997.

MOGHRABI, A. et al. Results of the Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium Protocol 95-01 for children with acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 109, p. 896-904, 2007.

MORI, H. et al. Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.99, p. 8242-8247, 2002.

MURPHY, S. B. et al. Nonrandom abnormalities of chromosome 9p in childhood acute lymphoblastic leukemia: Association with high-risk clinical features. **Blood**, v. 74, p. 409-415, 1989.

MURPHY, S. B. et al. Results of treatment of advanced-stage Burkitt's lymphoma and B cell (Sig+) acute lymphoblastic leukemia with high-dose fractionated cyclophosphamide and coordinated high-dose methotrexate and cytarabine. **J Clin Oncol**, v.4, p.1732-1739, 1986.

MURRAY, L. et al. Association of early life factors and acute lymphoblastic leukaemia in childhood: historical cohort study. **Br J Cancer**, v. 86, p. 356-361, 2002.

NACHMAN, J. et al. Response of children with high-risk acute lymphoblastic leukemia treated with and without cranial irradiation: a report from the Children's Cancer Group. **J Clin Oncol**, v.16; p. 920-930, 1998.

NAGASAKA, M. et al. Four cases of t(4;11) acute leukemia and its myelomonocytic nature in infants. **Blood**, v. 61, p. 1174-1181, 1983.

NESBIT, M.E. et al. Presymptomatic central nervous system therapy in previously untreated childhood acute lymphoblastic leukaemia: comparison of 1800 rad and 2400 rad. A report for Children's Cancer Study Group. **Lancet**, v.1, p.461-466, 1981.

NORDGREN, A. et al. Spectral Karyotyping and interphase FISH reveal abnormalities not detected by conventional G-banding. **Eur J Haematol**, v. 68, p. 31-41, 2002.

NOURSE, J. et al. Chromosomal translocation t(1;19) results in synthesis of a homeobox fusion mRNA that codes for a potential chimeric transcription factor. **Cell**, v. 60, p.535-545, 1990.

NYGAARD, U. Flow cytometric DNA index, G-band karyotyping, and comparative genomic hybridization in detection of high hyperdiploidy in childhood acute lymphoblastic leukemia. **J Pediatr Hematol Oncol.**, v. 28, p. 134-140, 2006

NYLA, A. et al. Cytogenetic features in infants less than 12 months of age diagnosis of acute lymphoblastic leukemia: Impact of the 11q23 Breakpoint on outcome: a report of the childrens cancer group. **Blood**, v. 83, p. 2274-2284, 1994.

ODERO, M. D. Identification of new translocations involving *ETV6* in hematologic malignancies by fluorescence in situ hybridization and spectral karyotyping, **Genes Chromosomes Cancer**, v. 31, p. 134-142, 2001.

OHTAKI, K, et al. Near-triploid Ph-positive leukemia. **Cancer Genet Cytogenet**, v.18, p. 113-121, 1985.

OKCU, M. F. et al. Birth weight, ethnicity, and occurrence of cancer in children: a population-based, incident case-control study in the State of Texas, USA. **Cancer Causes Control**, v. 13, p. 595-602, 2002.

PAIS, A. et al. Identification of various MLL gene aberrations that lead to MLL gene mutation in patients with acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Res**, v. 29, p. 517-526, 2005.

PAJOR, L. et al. Combined metaphase, interphase cytogenetic and flow cytometric analysis of DNA content of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Cytometry**, v. 34, p. 87-94, 1998.

PALLISGARRD, N. et al. Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for simultaneous screening of 29 translocations and chromosomal aberrations in acute leukemia. **Blood**, v. 92, p. 574-588, 1998.

PANZER-GRUMAYER, E.R. et al. Rapid molecular response during early induction chemotherapy predicts a good outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 95, p. 790-794, 2000.

PARKIN, J.L, et al. Acute leukemia associated with the t(4;11) chromosome rearrangement: ultrastructural and immunologic characteristics. **Blood**, v. 60, p. 1321-1331, 1982.

PATTE, C. et al. Improved survival rate in children with stage III and IV B cell non-Hodgkin's lymphoma and leukemia using multiagent chemotherapy: results of a study of 114 children from the French Pediatric Oncology Society. **J Clin Oncol**, v. 4, p. 1219-1226, 1986.

PAULSSON, K. et al. Evidence for a single-step mechanism in the origin of hiperdiploidy childhood acute lymphoblastic leukemia. **Gen Chrom Cancer**, v. 44, p. 113-122, 2005.

PÉREZ-VERA, P. et al. Cytogenetics in acute lymphoblastic leukemia in mexican children: an institucional experience. **Arch Med Res**, v. 32, p. 202-207, 2001.

PÉREZ-VERA, P. et al. A Strategy to Detect Chromosomal Abnormalities in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia, **J Pediatr Hematol Oncol**, v. 26, p. 294-300, 2004.

PERKINS, D. et al. Regional Cancer Cytogenetics: A Report on 1,143 Diagnostic Cases. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 96, p. 64-80, 1997.

PERRILLAT, F. et al. Day-care, early common infections and childhood acute leukaemia: a multicentre French case-control study. **Br J Cancer**. v. 86, p. 1064-1069, 2002.

POLLAK, C.; HAGEMEIJER, A. Abnormalities of the short arm of chromosome 9 with partial loss of material in hematological disorders. **Leukemia**, v. 1, p. 541, 1987.

POLLOCK, B.H. et al. Differences of the survival of childhood, Pediatric oncology group study. **J Clin Oncol**, v. 18, p. 813-23, 2000.

POVDIN, D. et al. Maternal and birth characteristics in relation to childhood leukaemia. **Paed Perin Epidemiol**, v. 20; p. 312-322, 2006.

PRADO JR, P.C. et al. Análise de alterações citogenéticas em crianças com leucemia linfóide aguda. X Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica, Salvador – BA, 2006, p. 64 (abstract).

PRIEST, J.R. et al. Philadelphia chromosome positive childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, New York, v. 56, p. 15-22, 1980.

PRIGOGINA, E. L.; PUCHKOVA, G. P.; MAYAKOVA, S. A. Nonrandom chromosomal abnormalities in acute lymphoblastic leukemia of childhood. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 32, p. 183-203, 1988.

PRIVITERA, E. et al. Different molecular consequences of the 1;19 chromosomal translocation in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 79, p. 1781-1788, 1992.

PUI, C. H. Acute leukemias with the t(4;11)(q21;q23). **Leuk Lymphoma**, v. 7, p. 173-179, 1992.

_____. Acute lymphoblastic leukemia. **Pediatr Clin North Am**, v. 44, p. 831-846, 1997.

PUI, C. H, CRIST, W. M.; LOOK, T. *Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute lymphoblastic leukemia.* **Blood**, v. 76, p. 1449-1463, 1990.

PUI, C. H, KANE, J. R., CRIST, W. M. Biology and treatment of infant leukemias. **Leukemia**, v. 9, p. 762-769, 1995.

PUI, C. H. et al. Cytogenetic features and serum lactic dehydrogenase level predict a poor treatment outcome for children with pre-B-cell leukemia. **Blood**, v. 67, p. 1688-1692, 1986.

PUI, C. H. et al. An analysis of leukemic cell chromosomal features in infants. **Blood**, v. 69, p. 1289-1293, 1987.

PUI, C. H. et al. Hypodiploid is associated with a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 70, p. 247-253, 1987.

PUI, C. H. et al. Prognostic importance of structural abnormalities in children with hyperdiploid (>50 Chromosomes) acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 73, p. 1963-1967, 1989.

PUI, C. H. et al. Myeloid-associated antigen expression lacks prognostic value in childhood acute lymphoblastic leukemia treated with intensive multiagent chemotherapy. **Blood**, v. 75, p. 198-202, 1990.

PUI, C. H. et al. Near-triploid and near-tetraploid acute lymphoblastic leukemia of childhood, **Blood**, v. 76, p. 590-596, 1990.

PUI, C. H. et al. Characterization of childhood acute leukemia with multiple myeloid and lymphoid markers at diagnosis and at relapse. **Blood**, v. 78, p. 1327-1373, 1991

PUI, C. H. et al. Clinical characteristics and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with the t(4;11) (q21;q23): a collaborative study of 40 cases. **Blood**, v. 77, p. 440-447, 1991.

PUI, C. H. et al. Clinical significance of CD34 expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 82, p. 889-894, 1993.

PUI, C. H. et al. Immunologic, cytogenetic and clinical characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia with t(1;19)(q23;p13) or its derivative. **J Clin Oncol**, v. 12, p. 2601-2606, 1994.

PUI, C. H. et al. Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. **Lancet**, v. 359, p. 1909-1915, 2002.

PUI, C. H. et al. Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program** . v. 15. p. 118-145, 2004.

PULLEN, J.; SHUSTER, J.J.; LINK, M. Significance of commonly used prognostic factors differs for children with T cell acute lymphocytic leukemia (ALL), as compared to those with B- precursor ALL. A Pediatric Oncology Group (POG) study. **Leukemia**, v. 13, p. 1696-1707, 1999.

PUTTI, M.C. et al. Expression of myeloid markers lacks prognostic impact in children treated for acute lymphoblastic leukemia: Italian experience in AIEOP-ALL 88-91 studies. **Blood**, v. 92, p. 795-801, 1998.

RABBITS, T. H. Translocations, master genes and differences between the origins of acute and chronic leukemias. **Cell**, v. 67, p. 641-644, 1991.

RAIMONDI, S. C. Cytogenetics of childhood T-cell leukemia. **Blood**, v. 72, p. 1560-1566, 1988.

RAIMONDI, S. C. Cytogenetics of pre-B acute lymphoblastic leukemia with emphasis on prognostic implications of the t(1;19). **J Clin Oncol**, v. 8, p. 1380-1388, 1990.

RAIMONDI, S. C. Current status of cytogenetic research in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, New York, v. 81, p. 2237-2251, 1993.

RAIMONDI, S. C. 12p abnormalities and the *TEL* Gene (*ETV6*) in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia, **Blood**, New York, v. 90, p. 4559-4566, 1997.

RAIMONDI, S. C. Cytogenetics of acute leukemias. In: PUI, C. H. **Childhood Leukemias**. Cambridge, 2000, p. 168-96.

RAIMONDI, S. C. et al. Childhood acute lymphoblastic leukemia with chromosomal breakpoints at 11q23. **Blood**, v.73, p.1627-1634,1989.

RAIMONDI, S. C. et al. Hyperdiploid (47-50) acute lymphoblastic leukemia in children. **Blood**, New York, v. 79, 3245-3252, 1992.

RAIMONDI, S. C. et al. Fluorescence in situ hybridization: molecular probes for diagnosis of pediatric neoplastic diseases. **Cancer Invest**, v. 18, p. 135-147, 2000.

RAIMONDI, S. C. et al. Reassessment of the prognostic significance of hypodiploidy in pediatric patient with acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, v.98, p. 2715-2722, 2003.

RAIMONDI, S. C. et al. Near-triploidy and near-tetraploidy in childhood acute lymphoblastic leukemia: association with B-lineage blast cells carrying the ETV6-RUNX1 fusion, T-lineage immunophenotype, and favorable outcome. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 169, p. 50-57, 2006.

RAMOS, M. L. et al. Prognostic value of tumoral ploidy in a series of Spanish patients with acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 122, p. 124-30, 2000.

RATEI, R. et al. Immunophenotype and clinical characteristics of CD-45-negative and CD-45 positive childhood acute lymphoblastic leukemia. **Ann Hematol**, v. 77, p. 107-114, 1998.

RAYNAUD, S.D. et al. Cytogenetic abnormalities associated with t(12;21): a collaborative study of 169 children with t(12;21)-positive acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 13, p. 1325-1330, 1999.

REAMAN, G. et al. Acute lymphoblastic leukemia in infants less than one year of age: a cumulative experience of the Children's Cancer Study Group. **J Clin Oncol**, v. 3, p. 1513-1521, 1985.

REGO, E.M. et al. Characterization of acute lymphoblastic leukemia subtypes in Brazilian patients. **Leuk Res**, v. 20, p. 349-355, 1996.

REID, A. G. A t(12;17)(p13;q12) identifies a distinct TEL rearrangement-negative subtype of precursor-B acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 165, p. 64-69, 2006

REYNOLDS, P.; VON BEHREN, J.; ELKIN, E. P. Birth characteristics and leukemia in young children. **Am J Epidemiol**, v. 155, p. 603-613, 2002.

RIBEIRO, R. C, et al. Clinical and biologic hallmarks of the Philadelphia chromosome in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 70, p. 948-953, 1987.

RIBEIRO, R. C. et al. Clinical and biologic features of childhood T-cell leukemia with the t(11;14). **Blood**, v. 78, p. 466-470, 1991.

RITCHEY, A.K. et al. Improved survival of children with isolated CNS relapse of acute lymphoblastic leukemia. A Pediatric Oncology Group study. **J Clin Oncol**, v. 17, p. 3745-3752, 1999.

RIVERA, G. K. et al. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukaemia with reinforced early treatment and rotational combination chemotherapy. **Lancet**, v. 337, p.61, 1991.

ROBISON, L. L. et al. Birth weight as a risk factor for childhood acute lymphoblastic leukemia. **Ped Hematol Oncol**, v. 4, p. 63-72, 1987.

ROGALSKY, R.J. BLACK, G.B. REED, M.H. Orthopedic manifestations of leukemia in children. **J Bone Joint Surg Am**, v. 68, p. 494-501, 1986.

ROMANA, S. P. et al. High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 86, p. 4263-4269, 1995.

ROMANA, S. P et al. The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a TEL-AML1 gene fusion. **Blood**, v.85, p. 3662-3670, 1995.

ROMANA, S. P; LE CONAIT, M.; BERGER, R. t(12;21): a new recurrent translocation in acute lymphoblastic leukemia. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 9, p. 186-191, 1994.

ROSS, J. A. Big babies and infant leukemia: a role for insulin-like growth factor-1? **Cancer Causes Control**, v. 7, p. 553-559, 1996.

_____. Childhood cancer etiology: recent reports. **Med Ped Oncol**, v. 37, p. 55-58, 2001.

ROSS, J. A; POTTER, J.D; ROBISON, L.L. Infant leukemia, topoisomerase II inhibitors, and the MLL gene. **J Natl Cancer Inst**, v. 86; p. 1678-1680, 1994.

ROWLEY, J.D. et al. Mapping chromosome band 11q23 in human acute leukemia with biotinylated probes: Identification of 11q23 translocation breakpoints with a yeast artificial chromosome. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 87, p. 9358-9362, 1990.

ROWLEY, J.D. The critical role of chromosome translocations in human leukemias. **Annu Rev Genet**, v.32, p. 495-519, 1998.

ROYER-POKORA, B. et al. Molecular cloning of the translocation breakpoint in T-ALL t(11;14)(p13;q11): Genomic map of TCR alpha and delta region on chromosome 14q11 and long-range map of region 11p13. **Hum Genet**, v. 82, p. 264-270, 1989.

RUBIN, C. M.; LE BEAU, M.; MICK, R. Impact of chromosomal translocations on prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Oncol**, v. 9, p. 2183-2192, 1991.

RUBNITZ, J. E.; DOWNING, J. R.; PUI, C. H. TEL gene rearrangement in acute lymphoblastic leukemia: a new genetic marker with prognostic significance. **J Clin Oncol**, v. 15, p. 1150-1157, 1997.

RYAN, D. H. et al. Phenotypic Similarities and Differences Between CALLA-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia Cells and Normal Marrow CALLA-Positive B Cell Precursors. **Blood**, v. 70, p. 814-21, 1987.

RUSSO, C. et al. Philadelphia chromosome with monosomy 7 in childhood acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. **Blood**, v. 77, p. 1050-1056, 1991.

SANTANA, V. M. et al. Presenting features and treatment outcome of adolescents with acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v.4, p.87-90,1990.

SATHER, H.N. Age at diagnosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Med Pediatr Oncol**, v. 14, p.166-172, 1986.

SCHICHMAN, S. A. et al. ALL-1 partial duplication in acute leukemia. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.91, p. 6236-6239, 1994.

SCHIFF, C. et al. λ -like and V pre-B genes expression: an early B-lineage marker of human leukemias. **Blood**, v. 78, p. 1516-1525, 1991.

SCHLIEBEN, S. et al. Incidence and clinical outcome of children with BCR/ABL-positive acute lymphoblastic leukemia (ALL). A prospective RT-PCR study based on 673 patients enrolled in the German pediatric multicenter therapy trials ALL-BFM-90 and CoALL-05-92. **Leukemia**, v. 10, p. 957-963, 1996.

SCHNEIDER, N. R. et al. New recurring cytogenetic abnormalities and association of blast cell karyotypes with prognosis in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: a pediatric oncology group report of 343 cases. **Blood**, 2543-2549, 2000.

SCHRAPPE, M. et al. Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. **Leukemia**, v.14, p. 2205-2222, 2000.

SCHROCK, E.; DU MANOIR, S.; VELDMAN, T. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. **Science**, v. 273, p. 494-497, 1996.

SCHULTZ, K. R. et al. Risk-and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). **Blood**, v.109, p. 926-935, 2007.

SECKER-WALKER, I.M.; LAWLER, S.D.; HARDISTY, R.M. Prognostic implications of chromosomal findings in acute lymphoblastic leukemia at diagnosis. **Br Med J**, v.2, p.1529-1530, 1978.

SECKER-WALKER, I.M. **Chromosomes and genes in acute lymphoblastic leukaemia**. New York: Chapman and Hall, 1997.

SECKER-WALKER, I.M. General Report on the European Union Concerted Action Workshop on 11q23. **Leukemia**, v. 12, p. 776-778, 1998.

SECKER-WALKER, I.M. Prognostic and biological importance of chromosome findings in acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 49, p. 1-13, 1990.

SECKER-WALKER, I.M; BERGER, R.; FENAUX, P. Prognostic significance of the balanced t(1;19) and unbalanced der(19)t(1;19) translocations in acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 6, p. 363-369, 1992.

SECKER-WALKER, I.M. et al. Chromosomes and other prognosis factors in acute lymphoblastic leukemia: a long term follow-up. **Br J Haematol**, v. 72, p. 336-342, 1989.

SEEGER, K. et al. TEL/AML1 fusion transcript in relapsed childhood with lymphoblastic leukemia: the Berlin-Frankfurt-Munster Study Group. **Blood**, v. 91, p. 1716-1722, 1998.

SEEGER, K; ADAMS, H. P.; BUCHWALD, D. TEL-AML1 fusion transcript in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. The Berlin-Frankfurt-Munster Study Group. **Blood**, v. 91, p. 1716-1722, 1998.

SHARPE, C. R.; FRANCO, E. L. Use of dipyrrone during pregnancy and risk of Wilms' tumor. **Epidemiology**, v. 7, p. 533-535, 1996.

SHERRATT, T.; MORELLI, C.; BOYLE, J. M. Analysis of chromosome 6 deletions in lymphoid malignancies provides evidence for a minimal region of deletion within a 2- megabase segment of 6q21. **Chrom Res**, v. 5, 118-124, 1997.

SHIKANO, T. et al. Balanced and unbalanced 1;19 translocation-associated acute lymphoblastic leukemias. **Cancer**, v. 58, p.2239-2243, 1986.

SHIMA, E.A, et al. Gene encoding the α chain of the T-cell receptor is moved immediately downstream of c-mys in a chromosomal 8;14 translocation in a cell line from a human T-cell leukemia. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.83, p.3439-3443, 1986.

SHU, X. et al. Diagnostic X-ray and ultrasound exposure and risk of childhood cancer. **Br J Cancer**, v. 70, p. 531–536, 1994.

SHURTLEFF, S.A. et al. TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patient with an excellent prognosis. **Leukemia**, v. 9, p. 1985-1989, 1995.

SHUSTER, J. J. et al. Prognostic factors in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. **Blood**, v. 75, p. 166-173, 1990.

SILVA, I. Z. et al. Expressão dos marcadores mielóides e prognóstico das leucemias linfóides agudas. **Pediatrics** (São Paulo), v. 26, p. 97-103, 2004.

SILVERMAN, L. B. et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. **Blood**, v. 97, p. 1211-1218, 2001.

SILVERMAN, L. B; SALLAN, S. E. Acute Lymphoblastic Leukemia. In: NATHAN, D. G. et al. **Hematology of Infancy and Childhood**. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2003, p. 1135-1166.

SIMONE, J.V. History of the treatment of childhood ALL: a paradigm for cancer cure. **Best Pract Res Clin Haematol**, v.19, p. 353-359, 2006.

SIMMONS, P. J.; TOROK-STORB, B. CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. **Blood**, v. 78, p. 2848-2853, 1991.

SMITH, M. A.; CHEN, T.; SIMON, R. Age-specific incidence of acute lymphoblastic leukemia in U.S. children: in utero initiation model. **J Natl Cancer Inst**, v. 89, p. 1542-1544, 1997.

SMITH, M. A et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Oncol**, v. 14, p. 18-24, 1996.

SMITH, M. A et al. Uniform criteria for childhood acute lymphoblastic leukemia risk classification. **J Clin Oncol**, v. 14, p. 680-681, 1996.

SOLOMONS, H. D. et al. Burkitt cell leukemia with abnormality of chromosome N° 1. **Am J Hematol**, v. 14, p.297-300, 1983.

STARK, B. et al. Leukemia of early infancy: Early B-cell lineage associated with t(4;11). **Cancer**, v. 58, p.1265-1271,1986.

STEINHERTZ, P. G. et al. Treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia with bulkyextramedullary disease and T-cell phenotype or other poor prognosis features: randomized controlled trial from the Children's Cancer Group. **Cancer**, v. 82, p. 600-612, 1998.

SULLIVAN, M. P. et al. Clinical and. biological heterogeneity of childhood B cell acute lymphocytic leukemia: Implications for clinical trials. **Leukemia**, v. 4, p. 6-11,1990.

TAUB, J. W. High frequency of leukemic clones in newborn screening blood samples of children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 99, p. 2992-2996, 2002.

THIRD INTERNATIONAL WORKSHOP ON CHROMOSOMES IN LEUKEMIA: Chromosomal abnormalities and their clinical significance in acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Res**, v. 43, p. 868, 1983.

TISCHKOWITZ, M.; DOKAL, I. Fanconi anaemia and leukaemia – clinical and molecular aspects. **Br J Haematol**, v. 126, p. 176-191, 2004.

TRAWECK, S. T. et al. Methylthioadenosine phosphorylase deficiency in acute leukemia: Pathologic, cytogenetic, and clinical features. **Blood**, v. 71, p. 1568-1573, 1988.

TRENT, J. M, et al. Report of the committee on structural chromosome changes in neoplasia. **Cytogenet Cell Genet**, v. 51, p. 533-562, 1989.

TRUEWORTHY, R. et al. Ploidy of lymphoblasts is the strongest predictor of treatment outcome in B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia of childhood: a Pediatric Oncology Group study. **J Clin Oncol**, v. 10, p. 606–613, 1992.

UCKUN, F. M. Clinical significance of translocation t(1;19) in childhood acute lymphoblastic leukemia in the context of contemporary therapies: a report from the Children's Cancer Group. **J Clin Oncol**, v. 16, p. 527-535, 1998.

UCKUN, F. M. et al. *Clinical features and treatment outcome of children with myeloid antigen positive acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group.* **Blood**, v. 90, p. 28-35, 1997.

UCKUN, F. M. et al. Immunophenotype-karyotype associations in human acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 73, p. 271-280, 1989.

UCKUN, F. M.; SENSEL, M. G.; SUN, L. Biology and treatment of childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 91, p. 735-746, 1998.

UDAYAKUMAR, A. et al. Cytogenetic profile of childhood acute lymphoblastic leukemia in Oman. **Arch Med Res**, v.38, p.305-312, 2007.

UDERZO, C. et al. Treatment of isolated testicular relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: an italian multicenter study. Associazione Italiana Ematologia ed Oncologia Pediatrica. **J Clin Oncol**, v. 8, p. 672-677, 1990.

UNIFESP, Escola Paulista de Medicina. Disponível em << <http://www.virtual.epm.br> >> Acesso em março de 2007.

VALLE et al. Prognostic value of myeloid-associated antigen expression (CD13 and/or CD33) in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Med Pediatr Oncol**, v. 39, p. 322, 2002

VAN DEN, B. H. et al. Favorable outcome after 1 year treatment of childhood T-cell lymphoma/ T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Med Pediatr Oncol**, v. 30, p. 46-51, 1998.

VAN DER PLAS, D.C. et al. 12p chromosomal aberrations in precursor B childhood acute lymphoblastic leukemia predict an increased risk of relapse in the central nervous system and are associated with typical blast cell morphology. **Leukemia**, v. 8, p.2041-2043, 1994.

VAN DONGEN, J. J. et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. **Lancet**, v. 352, p. 1731–1738, 1998.

VEIGA, L. B. A. **Estudo molecular por FISH da translocação t(12;21)(p13;q22)em pacientes com LLA**, 2003. Dissertação de Mestrado em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

VEIGA, L. B. A. et al. High frequency of t(12;21)(p13;q22) in children with acute lymphoblastic leukemia and know clinical outcome in southern Brazil. **Leuk Res**, v. 28, p. 1033-1038, 2004.

WEISS, S. W.; NICKOLOFF, B. J. CD34+ is expressed by a distinctive cell population in peripheral nerve, nerve sheath tumors, and related lesions. **Am J Surg Pathol**, v. 17, p. 1039-1045, 1993.

WHITEHEAD, V. M. et al. Accumulation of high levels of methotrexate polyglutamates in lymphoblasts from children with hyperdiploid (greater than 50 chromosomes) B-lineage acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. **Blood**, v. 80, p. 1316-23, 1992.

WIEMELS, J. L. et al. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. **Lancet**, v. 354, p. 1499-1503, 1999.

WIEMELS, J. L. et al. Protracted and variable latency of acute lymphoblastic leukemia after TEL-AML1 gene fusion in utero. **Blood**, v. 94, p. 1057-1062, 1999.

WIEMELS, J. L; GREAVES, M. Structure and possible mechanism of TEL/AML1 gene fusion in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Res**, v. 59, p. 4075-4082, 1999.

WIERSMA, S. R. et al. Clinical importance of myeloid-antigen expression in acute lymphoblastic leukemia of childhood. **N Engl J Med**, v. 324, p. 800-808, 1991.

WILLIAMS, D.L. New chromosomal translocations correlate with specific immunophenotypes of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Cell**, v. 36, p. 101-109, 1984.

WILLIAMS, D.L. et al. Presence of clonal chromosome abnormalities in virtually all cases of acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**, v. 313, p. 640-641, 1985.

WILLIAMS, D.L. et al. Chromosomal translocations play a unique role in influencing prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v.68, p.205-212, 1986.

WILLIS, T. G. et al. Rapid molecular cloning of rearrangements of the IGHJ locus using long-distance inverse polymerase chain reaction. **Blood**, v. 90, p. 2456-2464, 1997.

WINICK, N.J.et al. Treatment of CNS relapse in children with acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. **J Clin Oncol**, v.11, p.271-276, 1993.

WOO, H.Y. et al. Molecular Cytogenetic analys of gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia. **J Kor Med Sci**, v. 20, p. 36-41, 2005.

YAGI, T. et al. Detection of clonotypic IGH and TCR rearrangements in the neonatal blood spots of infants and children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 96, p. 264-268, 2000.

YEAZEL, M. W. et al. High birth weight and risk of specific childhood cancers: a report from the Children's Cancer Group. **J Ped**, v. 131, p. 671-677, 1991.

YEHUDA-GAFNI, O. et al. Fluorescence in situ hybridization analysis of the cryptic t(12;21)(p13;q22) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia, **Cancer Genet Cytogenet**, v. 132, p. 61-64, 2002.

YOFFE, G. et al. The chromosome translocation (11;14)(p13;q11) associated with T-cell acutelymphocytic leukemia: An 11p13 breakpoint cluster region. **Blood**, v. 74, p. 374-379, 1989.

ZEMANOVA, Z. et al. Prognostic value structural chromosomal rearrangement and small cell clones with high hyperdiploidy in children with acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Res**,v. 29, p. 273-81, 2005.

ZEN, P.R.G. et al. Prevalence of TEL/AML1 fusion gene in brazilian pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 151, p. 68-72, 2004.

ZIEMAN-VAN DER POEL, S. et al. Identification of a gene MLL that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.88, p.10735-10739,1991.

ANEXOS

**PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS
DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ**

**PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS
DO HOSPITAL INFANTIL PEQUENO PRÍNCIPE (CURITIBA)**